Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes

(Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. W. Zimmermann)

DIE AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG EINIGER AEROBER UND ANAEROBER BAKTERIEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1969

vorgelegt von
HARTWIN BIEBER
geb. am 21.11.1941 in Dresden

Dekan: Prof. Dr. med. G. Dhom
Referent: Prof. Dr. med., Dr. phil. W. Zimmermann

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes

(Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. W. Zimmermann)

DIE AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG EINIGER AEROBER UND ANAEROBER BAKTERIEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1969

vorgelegt von
HARTWIN BIEBER
geb. am 21.11.1941 in Dresden

Dekan: Prof. Dr. med. G. Dhom
Referent: Prof. Dr. med., Dr. phil. W. Zimmermann

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 3. Nov. 1969 abgelegt.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

B. Besprechung des Schrifttums

C. Methodik der eigenen Versuche
   I. Züchtung der Bakterien
   II. Analyse der Bakterientrockensubstanz

D. Ergebnisse

E. Vergleich und Diskussion

F. Zusammenfassung

G. Literaturverzeichnis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542713_0005

A. Einleitung

Die ersten ausführlicheren Untersuchungen der Aminosäurezusammensetzung von Bakterieneiweißen wurden kurz nach der Jahrhundertwende vorgenommen. Nachdem schon LEACH (1905/1906) den Histidin-, Arginin- und Lysingehalt von Escherichia coli quantitativ bestimmt hatte, wurde von TAMURA (1913, a, b) eine umfassendere qualitative und quantitative Analyse der Aminosäurezusammensetzung von Mycobacterium tuberculosis durchgeführt. Es gelang dem Autor, folgende Aminosäuren aus der Leibessubstanz dieser Bakterienart zu isolieren: Histidin, Arginin, Lysin, Phenylalanin, Prolin und Valin. Qualitativ nachgewiesen wurden Tryptophan und Tyrosin.

Später bestimmten JOHNSON und BROWN (1922) u.a. den Cystin-N-Gehalt von M. tuberculosis. CAMPBELL (1925) beschrieb ausgehend von 450 g Bakterientrockensubstanz den Arginin-, Lysin-, Tyrosin- und Tryptophangehalt des gleichen Erregers.

KISHINO (1930) kam nach der Analyse des Bakterieneiweißes von E. coli zu dem Schluß, daß E. coli kein Cystin enthalte. ECKSTEIN und SOULE (1931) bestätigten dieses Ergebnis. Sie bestimmten außerdem den Arginin-, Lysin-, Histidin-, Tyrosin- und Tryptophangehalt von E. coli.

Diese vor 1945 vorgenommenen Untersuchungen des Aminosäuregehaltes von Bakterien hatten mit großen Schwierigkeiten zu kämpfen, da die damals üblichen Verfahren der Aminosäurebestimmung viel zu große Mengen an Untersuchungsmaterial erforderten. Erst mit der Entwicklung der mikrobiologischen Nachweismethodik für Aminosäuren und mit der Einführung der Papierchromatographie durch CONSDEN, GORDON und MARTIN(1944) wurden Methoden geschaffen, die es erlaubten, mit kleinsten Mengen von Eiweißhydrolysaten relativ einfach die komplexe Aminosäurestruktur von

Bakterienzellen zu analysieren. Die Veröffentlichungen über Analysen der Aminosäurezusammensetzung von Bakterien nahmen in der Folgezeit dann auch rasch zu. Manche Autoren versuchten, mit Hilfe der Aminosäureanalysen das chemische Substrat für die unterschiedliche Gramfärbbarkeit (FREELAND und GALE, 1947; SOROKIN, 1965), für die unterschiedliche Virulenz der Mycobakterien (HIRSCH und CATTANEO, 1959) und der Brucellen (TEPPER und WILSON, 1958; WILSON und DASINGER , 1960), für die unterschiedliche Resistenz von Staphylokokken (MOROS, 1960), von Brucellen (DESSIu.a., 1960) und von M. tuberculosis B.C.G. (SORU, 1961) gegenüber verschiedenen Antibiotika zu finden. Die Aminosäurezusammensetzung von Bakterien wurde auch analysiert, um die Bakterienproteine auf ihre Verwendbarkeit als Nahrungsmittel zu untersuchen (ANDERSON, RHODES u.a., 1958; ANDERSON und JACKSON, 1958). ROMAHN u.a. (1961) diskutierten nach Analyse des Aminosäuregehaltes der Leibessubstanz von Lactobacillus bifidus die Bedeutung des Bakterieneiweißes dieses Keimes für die Versorgung des Säuglingsorganismus mit Aminosäuren.

Unseres Wissens sind jedoch vergleichende Untersuchungen der Aminosäurezusammensetzung von Bakterien unter Berücksichtigung der Aerobie und Anaerobie der untersuchten Keime nur von KISHINO (1930) für den Cystingehalt der Bakterienarten E. coli, Vibrio cholerae, M. tuberculosis, Clostridium perfringens und Clostridium sporogenes gemacht worden. Außerdem gibt es in der uns bekannten Literatur, abgesehen von der eben erwähnten Untersuchung, kaum irgendwelche Daten über den Gehalt von Bakterien an den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Cystin. Eine große Informationslücke besteht auch ohne Zweifel hinsichtlich des quantitativen Aminosäuregehaltes der Clostridien. Diese Lücke soll unsere Untersuchung mithelfen zu schließen.

B. Besprechung des Schrifttums

Da der analytische Teil dieser Arbeit ausschließlich die Aminosäureanalyse der Gesamtbakterienzelle zum Thema hat, befassen wir uns hauptsächlich mit dem Schrifttum über die Aminosäurezusammensetzung der Gesamtbakterienleibessubstanz und streifen nur kurz die Aminosäurezusammensetzung der Bakterienzellwände. Von den Arbeiten, die sich mit der Aminosäurezusammensetzung der Bakterien beschäftigen, besitzen nur solche Untersuchungen, die nach 1945 vorgenommen wurden, einen über ihre historische Bedeutung hinausgehenden Wert für den heutigen Stand der Erkenntnis auf dem Gebiet der Bausteinanalyse der Bakterieneiweiße. Diese nach 1945 durchgeführten Untersuchungen bedienten sich vor allem mikrobiologischer und nach Entwicklung der Papierchromatographie auch chromatographischer Bestimmungsverfahren.

Mit der mikrobiologischen Nachweismethode bestimmten CAMIEN u.a. (1945) den quantitativen Gehalt der Gesamtzellsubstanz von Lactobacillus arabinosus, pentosus, casei und fermenti an Arginin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin sowie den Gehalt von E. coli an Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Tryptophan und Valin. STOKES und GUNNES (1946) untersuchten unter Verwendung derselben Methodik die Aminosäurezusammensetzung von Staphylococcus aureus, E. coli und Bacillus subtilis. Sie gaben neben den von CAMIEN u.a. (1945) bestimmten Aminosäuren von E. coli auch noch quantitative Daten für den Arginin-, Methionin-, Threonin- und Phenylalaningehalt dieses Keimes an. Als weiterer Untersucher der quantitativen Aminosäurezusammensetzung von E. coli bediente sich DUNLOP (1949) ebenfalls des mikrobiologischen Verfahrens.

FREELAND und GALE (1947) bestimmten den Arginin-, Lysin-, Histidin-, Tyrosin- und Glutaminsäuregehalt von E. coli, Aerobacter aerogenes,

Streptococcus faecalis und Staphylococcus aureus mit Hilfe spezifischer Decarboxylasen. Sie fanden bei den grampositiven Kokken einen um die Hälfte geringeren Arginingehalt als bei den gramnegativen Kokken. Die von STOKES und GUNNES (1946) angegebenen Daten unterstützen dieses Ergebnis.

POLSON (1948) verwendete als einer der ersten die Papierchromatographie zur quantitativen Analyse der Aminosäurezusammensetzung von E. coli. Die Aminosäuren von Corynebacterium diphtheriae analysierte WORK (1949; 1950) unter Verwendung der papierchromatographischen Methodik. Die Autorin fand dabei eine damals als Bestandteil der Leibessubstanz von Bakterien noch unbekannte Aminosäure, die sie isolierte und als α,ε - Diaminopimelinsäure identifizierte (WORK, 1951). Diese Aminosäure wurde dann auch in der Leibessubstanz von M. tuberculosis nachgewiesen (WORK, 1951; PAULETTA und DEFRANCESCHI, 1952; RAO und WADHWANI, 1956; GREBUS u.a., 1965) und später als weit verbreiteter Bestandteil der Bakterienzelle erkannt (WORK und DEWEY, 1953).

Unter Verwendung der mikrobiologischen Methode untersuchten MONDOLFO und HOUNIE (1951) die quantitative Aminosäurezusammensetzung von E. coli, Salmonella typhosa, paratyphi A, schottmuelleri und enteritidis, Shigella dysenteriae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes und Gaffkya tetragena und verglichen sie mit der Aminosäurezusammensetzung tierischer Organe. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß Bakterienproteine mehr Isoleucin, Threonin, Arginin, Glutaminsäure und Valin enthalten als tierische Eiweiße. Andererseits wurde festgestellt, daß tierische Proteine mehr Prolin, Serin, Tyrosin, Phenylalanin und Glycin besitzen als Bakterieneiweiße.

SCHREIER und RUTHE (1955) bestimmten mikrobiologisch den Aminosäuregehalt pathogener und apathogener Colistämme, ohne einen Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung feststellen zu können, und bewiesen die Abgabe essentieller und anderer Aminosäuren an das Medium. KANDLER

und ZEHENDER (1956) analysierten 30 verschiedene Bakterienstämme papierchromatographisch auf ihren Aminosäuregehalt. Sie kamen zu der Ansicht, daß alle Bakterien eine gemeinsame Grundstruktur aus folgenden Aminosäuren besitzen: Glutaminsäure, Glycin, Leucin, Valin, Arginin, Asparaginsäure, Lysin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Prolin, Tyrosin, Histidin und eventuell auch noch Tryptophan und Cystin.

REUSSER u.a. (1957) befaßten sich mit der papierchromatographischen Analyse des Gehaltes von 19 Mikroorganismen an essentiellen Aminosäuren. Sie fanden bei allen untersuchten Arten große Mengen der für das Problem der Welternährung bedeutsamen Aminosäure Lysin und betonten aus diesem Grunde die Bedeutung der Mikrobenproteine als Ergänzung für die menschliche Ernährung.

SIEFERT (1958) beschrieb u.a. den Aminosäuregehalt von Leptospira biflexa, von Reiterspirochaeten und von Treponema pallidum. Im Cytoplasma von Leptospira biflexa fand sich unter den freien Aminosäuren auch Hippursäure. Diese Aminosäure war bisher noch nie in einem einzelligen Organismus nachgewiesen worden. Im übrigen ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede im Aminosäuregehalt dieser Spirochaeten. Eine Übersicht über die Zellstruktur und auch über die Serologie der Leptospiren gab BABUDIERI (1960).

Die Aminosäurezusammensetzung des Cytoplasmas von Sarcina lutea, flava, rosea und citrea wurde von SAVOIA (1959) chromatographisch bestimmt. Sie wiesen die Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Serin, Alanin, Threonin, Tyrosin, Histidin, Arginin, Lysin, Prolin, Methionin, Valin, Leucin und Phenylalanin nach, die mit Ausnahme von Alanin und Methionin alle der von KANDLER und ZEHENDER (1956) beschriebenen "Grundstruktur" zugehörig sind.

MUKHERJEE (1959) beschrieb das Aminosäuremuster der Leibessubstanz der roten Schwefelbakterien und fand, daß die schwefelhaltigen Aminosäuren dieses Keimes vor allen Dingen im Bakterieneiweiß gebunden vorkommen und nicht als freie Aminosäuren vorliegen.

Die qualitative Aminosäurezusammensetzung der vegetativen Zellen und der Sporen von 43 Clostridienstämmen untersuchte unseres Wissens bisher als einziger RYMKIEWICZ (1959; 1960). Die Sporen und vegetativen Formen von Cl. bifermentans, Cl. sporogenes, Cl. sordelli, Cl. histolyticum und Cl. botulinum enthielten immer Alanin, Asparaginsäure, Phenylalanin, Glycin, Lysin, Prolin, Serin, Valin und Tryptophan. In den vegetativen Zellen von Cl. perfringens Typ A war regelmäßig Phenylalanin, Glycin, Glutaminsäure, Histidin, Prolin, Serin und Valin, in den vegetativen Zellen von Cl. perfringens Typ B, C, D, E, F Phenylalanin, Glycin, Serin, Valin, Asparaginsäure und Tryptophan vorhanden. Die beiden Aminosäuren Methionin und Tyrosin wurden regelmäßig in den Sporen aller Clostridien, nie jedoch in den vegetativen Zellen gefunden. Bei den übrigen Proteinaminosäuren zeigte sich ein mehr unterschiedliches Verhalten der einzelnen Clostridienstämme. Derselbe Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung von Spore und vegetativer Zelle ergab sich schon bei den chromatographischen Untersuchungen bakterieller Sporen von FRANKLIN und WILLIAMS (1952). Bacillus globigii enthielt als vegetative Zelle auch kein Tyrosin und Methionin, jedoch als Spore.

Mit der quantitativen Aminosäurezusammensetzung von Cholera- und choleraähnlichen Vibrionen befaßte sich PUSSTOWALOWA (1961). Unter Verwendung der Papierchromatographie wies der Autor 21 verschiedene Aminosäuren und zwei nicht identifizierte Verbindungen nach. Es ergaben sich keine qualitativen Aminosäureunterschiede zwischen den einzelnen Vibrionenarten. Jedoch war der Methioningehalt der Choleravibrionen doppelt so groß, der Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin dagegen nur halb so groß wie bei choleraähnlichen Vibrionen.

Die Aminosäurezusammensetzung von Azotobacter chroococcum, vinelandii, agilis und indicus beschrieben PURKAYASTHA und NANDI (1962). Die Aminosäurestruktur dieser Bakterien war ungefähr gleich. Es fiel der nur geringe Gehalt an freien Aminosäuren in der Leibessubstanz der untersuchten Azotobacterarten auf. COPPOLA (1964/65) untersuchte das Aminosäuremuster von Azotobacter chroococcum ebenfalls. Er wies im Zellhydrolysat dieses Keimes alle Aminosäuren der "Grundstruktur" von KANDLER und ZEHENDER (1956) nach, zusätzlich jedoch noch Alanin und Isoleucin.

SEN (1962) bestimmte den Vorrat an freien Aminosäuren von Shigella dysenteriae und Shigella flexneri. Die beiden Stämme unterschieden sich nicht wesentlich in der Zusammensetzung ihres Gehaltes an freien Aminosäuren.

Die Aminosäurezusammensetzung haemolytischer Streptokokken von Scharlachkranken und von Mikrobenträgern sowie typenspezifischer Stämme haemolytischer Streptokokken verglichen JAREMKO und KARBATSCH (1964) miteinander. Sie fanden in den Keimen von Scharlachkranken kein Cystin und Phenylalanin, jedoch in der Leibessubstanz typenspezifischer Stämme. Die Keime von Mikrobenträgern und die typenspezifischen Stämme wiesen in der Regel die gleiche Aminosäurezusammensetzung auf.

PARNAS (1965) untersuchte u.a. die Aminosäurestruktur von Brucellen und anderen Brucellaceae. Hinsichtlich des Aminosäuregehaltes fanden sich nur Unterschiede zwischen den R-Formen und den S-Formen, jedoch keine zwischen den Brucellen und anderen Brucellaceae.

In jüngerer Zeit beschäftigten sich drei Arbeiten mit der Bausteinanalyse der Bakterieneiweiße. OBRAZCOVA und PETRENKO (1966) befaßten sich mit der Aminosäurezusammensetzung einiger Rhizosphärenbakterien, PURSER und BUECHLER (1966) mit dem Aminosäuregehalt eines repräsentativen Querschnittes durch die Stämme von Pansenbakterien, die bei Verfütterung von Konzentraten oder Weidefutter angetroffen werden. Den Gehalt an freien

Aminosäuren bei Proteus vulgaris beschrieben SAPOSNIKOV und ISAEVA (1967). Es ergaben sich Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung bei verschiedener Milchsäurekonzentration im Medium.

Die Zusammensetzung der Bakterienzellwände ist bei den verschiedenen Arten unterschiedlich. Eine Zellwandfraktion - die als "mucopeptide" bezeichnete "basal unit" (WORK, 1957) - ist jedoch sowohl grampositiven als auch gramnegativen Bakterien gemeinsam (WORK, 1962). Diese Grundeinheit bleibt nach Befreiung der Zellwände von Wandproteinen und cytoplasmatischen Bestandteilen durch Behandlung mit Trypsin und Ribonuclease zurück. Die "Mucopeptide" aller Bakterien enthalten die beiden Hexosamine Muraminsäure (3-0-α-Carboxyäthylhexosamin) und Glucosamin, die drei Aminosäuren Glutaminsäure, Alanin und entweder Lysin oder α,ε -Diaminopimelinsäure. Bei einigen Arten kommen Glycin oder Asparaginsäure auch noch als Hauptbestandteile vor (WORK, 1961; 1962; CUMMINS und HARRIS, 1956; 1958; CUMMINS, 1956). Andere Aminosäuren sind nur in Spuren vorhanden. Nach Ansicht von CUMMINS und HARRIS (1956) ist es noch unmöglich zu entscheiden, ob diese als Nebenbestandteile nachgewiesenen Aminosäurespuren Teile der beschriebenen Basaleinheit der Zellwände sind, ob sie nur die Überbleibsel der oberflächlichen Proteinschicht der Zellwände darstellen oder ob sie als Reste von Cytoplasma in den Zellwandsuspensionen anzusprechen sind. Die Zellwände gramnegativer Bakterien sind komplizierter gebaut als diejenig von grampositiven. Zellwände gramnegativer Bakterien enthalten sehr viel mehr Lipide und die meisten der im Cytoplasma vorkommenden Aminosäuren, darunter auch aromatische und schwefelhaltige Aminosäuren, die in den gereinigten Zellwänden grampositiver Organismen fehlen (SALTON, 1956), aber weniger Hexosamine (WORK, 1957). Die Mucopeptidkonzentration ist in den gramnegativen Bakterienzellwänden geringer.
Mucopeptide und cytoplasmatische Proteine scheinen unabhängig voneinander synthetisiert zu werden. Beide können auch getrennt durch Antibiotika gehemmt werden (WORK, 1962).

C. Methodik der eigenen Versuche

I. Züchtung der Bakterien

1. Bakterienarten: Zur Anzüchtung werden die Aerobier und fakultativen Anaerobier Escherichia coli (ATCC 11105) und Bacillus subtilis (ATCC 6051), der fakultative Aerobier Pseudomonas aeruginosa (ATCC 10145) und die Anaerobier Clostridium sporogenes (CIP 6053) und Clostridium perfringens (Max von Pettenkofer-Institut, Berlin, "c 25") ausgewählt.

2. Nährmedium: Als geeignetes Nährsubstrat für diese Bakterien erweist sich das "standard culture medium for general bacteriology" von MARSHALL und KELSEY (1960), da auf diesem Nährmedium ein sehr gutes Wachstum aller untersuchten Bakterienarten zu erzielen ist und die Trennung der Bakterien von dem flüssigen Nährboden leicht durch Zentrifugieren bewerkstelligt werden kann.

Tabelle Nr. 1

Zusammensetzung des Mediums

Casein Hydrolysate Acid (Oxoid L 41)	10 g
Yeast Extract (Oxoid L 21)	5 g
Natriumglycerophosphat	10 g
Kaliumlactat (50 % g/g)	10 ml
Glucose	2 g
Anorg. Salzlösung	5 ml
Wasser	ad 1 000 ml

pH 7,0 - 7,2

Zusammensetzung der Salzlösung:
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 4,0 g; $MnSO_4 \cdot 1\ H_2O$ 0,3 g;
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,4 g; H_2O ad 100 ml;
mit 2 Tropfen 10 n H_2SO_4 ansäuern.

Die aufgeführten Bestandteile des Mediums werden in der angegebenen Reihenfolge in Wasser gelöst. Dann wird auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert der Nährbouillon wird mit 10%iger Natronlauge auf 7,15 eingestellt. Dann füllt man das Medium in 4 Portionen zu je 250 ml in die Brutkolben ab und autoklaviert 20 min. bei 120°C. Die Nährbouillon für die Anaerobierzüchtung wird unter N_2/CO_2-Atmosphäre aufbewahrt.

Es ist erforderlich, alle Bakterien auf dem gleichen Nährboden zu züchten, damit eine unterschiedliche Beeinflussung des qualitativen oder quantitativen Aminosäuregehaltes der einzelnen Bakterienarten durch die Nährbodenzusammensetzung vermieden wird. Die Literatur bietet hinsichtlich der Beeinflussung der Bakterienzusammensetzung von seiten der Wachstumsbedingungen nur widersprüchliche Ansichten. Nach der Ansicht von ABDERHALDEN und RONA (1905), TAMURA (1913, b) und CAMIEN u. a. (1945) ist die Aminosäurezusammensetzung unabhängig von der Art des Nährbodens. STOKES und GUNNES (1946) kommen aufgrund ihrer Bestimmungen des Aminosäuregehaltes von Bakterien nach Züchtung unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu dem Schluß, daß die Aminosäurezusammensetzung eines Organismus unter fixierten Wachstumsbedingungen eine stabile und charakteristische Eigenschaft der Zelle ist. Die bei ihren Untersuchungen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen aufgetretenen Unterschiede im Aminosäuregehalt von Streptomyces griseus, Penicillium notatum, Bac. subtilis und E. coli sind nach Meinung dieser Autoren mehr durch Variation des Enzymmusters als durch Variation der Zellstrukturproteine bedingt. FREELAND und GALE (1947) schließen aus ihren Analysen der Aminosäurezusammensetzung von Bakterien mit spezifischen Decarboxylasen, daß keine Abhängigkeit des Aminosäuregehaltes verschiedener Mikroorganismen von den Wachstumsbedingungen besteht. Auch DUNLOP (1949) und SCHREIER und RUTHE (1955) sind der Überzeugung, daß der Aminosäuregehalt der Leibessubstanz eines jeden Stammes der von diesen Autoren untersuchten Bakterienart E. coli eine für ihn charakteristische und genetisch festgelegte Eigenschaft darstellt und daß die Ernährungsbedingungen darauf keinen Einfluß ausüben. Die Untersuchungen von WRIGHT und LOCKHART (1965) an E. coli zeigen jedoch eine Variation der durchschnitt-

lichen Zellgröße und des Gehaltes der Zellen an RNS, Protein und Aminosäuren mit der Wachstumsgeschwindigkeit und mit der Menge an wachstumsregulierenden Nährsubstanzen. Die Analysen der Aminosäurezusammensetzung der Zellwände von Bac. subtilis von YOUNG (1965) weisen während des Wachstums auf verschiedenen Medien ebenfalls erhebliche Unterschiede im Aminosäuregehalt in Abhängigkeit von der Bebrütungsdauer und der Nährbodenzusammensetzung auf. Weitere Beispiele für die "Wirkung der Umgebung auf die Zusammensetzung von Bakterienzellen" sind in der Übersicht von NEIDHARDT (1963) aufgeführt.

3. Zuchtmethode: Alle verwendeten Bakterien werden durch mehrere Passagen an das Medium gewöhnt. Von jeder Bakterienart legen wir 4 Kulturen auf 250 ml - Nährmedien an. Die Beimpfung der Medien erfolgt durch gleiche Mengen von wässrigen Bakteriensuspensionen, die von Schrägagarkulturen durch Aufschwemmen der Bakterien in sterilem Wasser gewonnen werden. Ps. aeruginosa, Bac. subtilis und E. coli werden dann zur Züchtung unter aeroben Bedingungen bei 37°C geschüttelt, Cl. perfringens und Cl. sporogenes sowie ein weiterer Stamm E. coli unter N_2/CO_2-Atmosphäre im Zeisslertopf bei 37°C bebrütet.

Die Entnahme aller Bakterien erfolgt zum Zeitpunkt der größten Wachstumsdichte, da dann die Anreicherung von Stoffwechselprodukten in der Nährbouillon der weiteren Vermehrung der Keime entgegenwirkt und mögliche Unterschiede im Aminosäuregehalt, wie sie RAO und WADHWANI (1956) in Abhängigkeit vom Kulturalter bei ihren Untersuchungen an M. tuberculosis sowie auch YOUNG (1965) beobachteten, nicht ins Gewicht fallen dürften. Zur Bestimmung dieses Zeitpunktes nimmt man mehrmalige photometrische Trübungsmessungen zur Aufstellung einer Wachstumskurve bei einer gesonderten, auf gleiche Weise behandelten und gleichzeitig bebrüteten Kultur vor. Die durch die Trübung hervorgerufenen Extinktionen werden in 1 cm-Küvetten bei 436 nm im Eppendorf-Photometer gegen die unbeimpfte Nährbouillon als Nullwert gemessen. Bei den unter aeroben Bedingungen bebrüteten Bakte-

rien gewinnt man die Proben zur Extinktionsmessung mit einer sterilen Pipette. Die Messungen während der Anaerobierzüchtung werden mit Hilfe eines besonderen Brutkolbens mit angeschlossener Küvette vorgenommen.

An einen Brutkolben wird über ein in Bodennähe angeschmolzenes Ansatzrohr und über einen daran befestigten, autoklavierbaren Gummischlauch eine 1 cm-Küvette angeschlossen. Beim Kippen des Kolbens fließt die bakterienhaltige Nährbouillon in die Küvette, wenn für den Luftausstrom aus der Küvette durch einen weiteren Schlauch gesorgt ist, der lose in dem die Küvette und den Brutkolben verbindenden Gummirohr verläuft und in den Luftraum über dem Brutkolbeninhalt mündet. Hebt man aber die Küvette an, so strömt die Bakteriensuspension wiederum in den Brutkolben und die Luft in die Küvette zurück. Die Abdichtung am küvettennahen Ende des äußeren Gummischlauches geschieht mit einem engen, fest schließenden Silikonschlauchstück. Da der verschlossene Brutkolben mit der angeschlossenen Küvette ein vollständig geschlossenes System darstellt, werden bei Verdrängung der Luft durch Stickstoff nach der Beimpfung während der Bebrütungsdauer streng anaerobe Bedingungen eingehalten. Bei Gasbildung durch die Bakterien kann der Druckausgleich durch ein in den Brutkolbenstopfen eingesetztes Ventil herbeigeführt werden.

Der Zeitpunkt der größten Wachstumsdichte wird von E. coli bei aerober Züchtung nach ca. 4 Std., bei anaeroben Bedingungen nach ca. 5 Std., von Ps. aeruginosa nach ca. 6 Std., von Bac. subtilis nach ca. 7 Std., von Cl. perfringens und Cl. sporogenes nach ca. 12 Std. Bebrütungsdauer erreicht.

Die bakterienhaltigen Nährlösungen werden dann sofort auf $0^{\circ}C$ gekühlt, um eine Bremsung des Bakterienstoffwechsels bei dem längere Zeit dauernden Zentrifugieren zu erreichen.

4. Trennung der Bakterien vom Nährboden: Wenn der Nährboden mit der Bakteriensuspension $0^{\circ}C$ erreicht hat, wird die Bakterienmasse vom flüssigen Nährboden bei 6000 Umdrehungen/min. abzentrifugiert. Nach Abgießen

der über den Bakterien stehenden Flüssigkeit wäscht man die Bakterienfeuchtsubstanz mit eisgekühltem destilliertem Wasser und zentrifugiert wieder ab, bis das Waschwasser ungefärbt bleibt. Das Auswaschen der Bakterienfeuchtsubstanz ist deswegen zu fordern, um anhaftende Aminosäuren, die vom Nährboden stammen, von der Zelloberfläche zu entfernen (SCHREIER und RUTHE, 1955). GALE (1945) gelang es, mit Hilfe spezifischer Decarboxylasen zu zeigen, daß die an den Bakterien haftenden Aminosäuren durch mehrmaliges Waschen mit Aqua destillata entfernt werden können.

Die gewaschene Bakterienfeuchtsubstanz wird tiefgefroren und dann lyophilisiert. In unseren Augen stellt die Gefriertrocknung das schnellste und schonendste Verfahren zur Gewinnung einer gewichtskonstanten Bakterientrockensubstanz dar.

Die Bakterientrockensubstanz bewahrt man im evakuierten Exsikkator über Phosphorpentoxid auf.

Von jeder Kultur werden nach der Hydrolyse der Amino-Stickstoff und die Aminosäuren bestimmt.

II. Analyse der Bakterientrockensubstanz

1. Oxydation der Bakterientrockensubstanz: Die Bestimmung des Cystein-, Cystin- und Methioningehaltes von Proteinen ist kompliziert durch die Instabilität dieser Aminosäuren während der Proteinhydrolyse, besonders aber bei Anwesenheit von Kohlenhydraten und Schwermetallspuren (HINSBERG und LANG, 1957). Eine Stabilisierung dieser Aminosäuren kann durch ihre Oxydation im intakten Proteinmolekül erreicht werden. Dabei werden Cystin und Cystein in Cysteinsäure und Methionin in sein Sulfon überführt. Cysteinsäure und

Methioninsulfon überstehen die Säurehydrolyse unzerstört.

Von TOENNIES und HOMILLER (1942) wurde eine Methodik zur Oxydation schwefelhaltiger Aminosäuren mit Perameisensäure erarbeitet, die später von verschiedenen Untersuchern auf Proteine angewandt worden ist. TOENNIES (1942) gebrauchte die Reaktion zur Oxydation von Casein, um Methionin in sein Sulfon zu überführen, SANGER (1949) zur Spaltung der Schwefelbrücken des Insulins als ersten Schritt zur Strukturaufklärung des Hormons. Von MUELLER u.a. (1951) wurde die Reaktion zur Oxydation des Oxytocins benutzt. HIRS (1956) untersuchte die verschiedenen Modifikationen der Perameisensäureoxydation bei seinen Studien über die chemische Struktur der Ribonuclease. KRAMPITZ (1957) nahm Untersuchungen zur Verbesserung der Eiweißhydrolyse durch Vorbehandlung der Proteine mit Perameisensäure an Fischmehl vor. MOORE (1963) gab eine Methode zur Verhinderung von Überoxydation durch Zusatz von HBr als Reduktionsmittel bei der Perameisensäureoxydation von Proteinen an.

Wir geben der von PIERCE (1955) beschriebenen und von HIRS (1956) und KRAMPITZ (1957) nachgeprüften Methode den Vorzug, bei der eine vollständige Überführung von Cystein/Cystin und Methionin in die Sulfone erzielt wird. Außer Tyrosin bleiben alle anderen Proteinaminosäuren unverändert (HIRS, 1956).

Zur Ausführung der Reaktion werden zuerst 20 mg Bakterientrockensubstanz in 10 ml fassende Glasröhrchen (Pyrex, 15 mm innere Weite, 200 mm Länge, 2 mm Wandstärke, Verjüngung bei 100 mm) eingewogen. Dann stellt man sich als Oxydationsreagenz ein Gemisch aus 0,5 ml 30%igem H_2O_2 (Merck, Darmstadt) und 4,5 ml 98%iger Ameisensäure (Merck, Darmstadt) her. 3 min. nach der Mischung der beiden Komponenten erfolgt die Zugabe von 0,8 ml der Perameisensäurelösung zu je 20 mg Bakterientrockensubstanz. Die Reaktion wird bei 50°C im Wasserbad durchgeführt und nach 15 min. durch Tieffrieren unterbrochen. Unmittelbar anschließend erfolgt die Lyophilisation der eingefrorenen Lösung.

2. Salzsaure Hydrolyse: Nach DUSTIN u.a. (1953) stellt die salzsaure Hydrolyse in stark verdünnter Lösung selbst in Gegenwart größerer Kohlenhydratmengen das schonendste Verfahren zur Aufspaltung von Proteinen dar. Tryptophan jedoch wird bei der salzsauren Hydrolyse fast vollständig zerstört.

Zur Hydrolyse der oxydierten Bakterienmasse werden 6 ml 6n HCl in das Glasröhrchen hinzugegeben. Dann schmilzt man das Reaktionsröhrchen durch Ausziehen an der Verjüngung zu und erhitzt die Ampulle für 18 Stunden auf 110°C im Trockenschrank (MOORE, 1963). Anschließend werden die bei der Hydrolyse entstandenen Humine durch Filtration mit Glasfritten der Größenordnung G 4 entfernt. Das quantitativ gewonnene Filtrat wird dann sofort lyophilisiert. Den Rückstand versetzt man mit genau 1 ml Aqua destillata und überschichtet mit einem Tropfen Toluol. Die Analysenlösung wird bei 0°C aufbewahrt. (FISCHER und DÖRFEL, 1953).

3. Bestimmung des Aminostickstoffes: Von den zur Verfügung stehenden Methoden zur Bestimmung der Gesamtaminosäuren hat sich die kolorimetrische Bestimmung des α-Amino-N mit Ninhydrin als das schnellste und eleganteste Verfahren erwiesen. Als erste haben MOORE und STEIN (1948) eine zuverlässige kolorimetrische Methodik zur Amino-N-Bestimmung angegeben. Wir bevorzugen das von TROLL und CANNAN (1953) modifizierte Verfahren.

Zuerst wird eine Eichkurve mit Glycin aufgestellt. Man wiegt zwischen 4 mg und 16 mg Glycin in Röhrchen ein und löst mit genau 1 ml Aqua destillata. 0,1 ml dieser Glycinlösung, die dem Bakterienhydrolysat entspricht, werden in 20 ml Aqua destillata einpipettiert. Von dieser Verdünnung werden 0,2 ml zur Amino-N-Bestimmung verwendet und dazu in 5 ml-Meßkolben gegeben. Man setzt 0,5 ml ammoniakfreies KCN-Pyridinreagenz und 0,5 ml ammoniakfreies Phenol (80 %ig in absolutem Äthanol) zu und erhitzt auf 100° C im Wasserbad. Dann pipettiert man 0,2 ml einer Ninhydrinlösung (500 mg in 10 ml absolutem Äthanol)

hinzu, verschließt mit einem Stopfen und erhitzt 3 - 5 min. weiter. Die Lösung wird abgekühlt und mit 60 %igem Äthanol auf 5 ml aufgefüllt. Man photometriert bei 578 nm. 0,2 ml ammoniakfreies Wasser werden als Leerwert ebenso behandelt.

Die Bestimmung der Amino-N-Gehalte der Bakterienhydrolysate wird auf gleiche Weise vorgenommen. Die ermittelten Werte liegen im Bereich der Eichkurve.

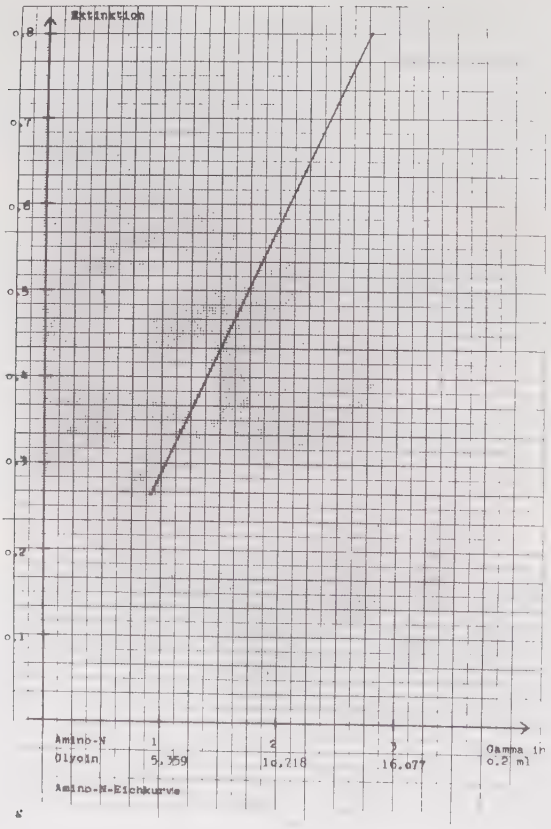

Abb. Nr. 1: Amino-N-Eichkurve

Alle Reagenzien müssen vor Ausführung der Amino-N-Bestimmung durch Schütteln mit Permutit von Ammoniakspuren befreit werden, da Ammoniak selbst eine 29,2 %ige Ausbeute des bei der Reaktion entstehenden Farbstoffes Diketohydrindylidendiketohydrindamin (DYDA) liefert. Sarkosin reagiert etwa wie Ammoniak. Harnstoff, Harnsäure, Kreatin, Kreatinin, Hippursäure, p-Aminobenzoesäure und Anilin ergeben keine Farbe. Peptide reagieren nicht quantitativ. Die Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte von Prolin und Hydroxyprolin, die eigentlich keine Aminosäuren, sondern Iminosäuren sind, sind mit dem von DYDA nicht identisch. Im übrigen ergeben außer Tryptophan (70 %) und Lysin (110 %) 14 weitere Aminosäuren 97 - 102 %ige Ausbeuten an DYDA.

Ähnliche Färbungen, wie sie bei der Reaktion von Aminosäuren mit Ninhydrin entstehen, können unter bestimmten Bedingungen auch bei Einwirkung von Ninhydrin auf weitere Substanzen wie Ammoniumsalze, Amine, Alkohole, Aldehyde, Ketone und Zuckerarten auftreten (BEILSTEIN VII, E I, 475). Mit der Ninhydrinreaktion werden also nicht nur die primären α- Aminogruppen der Aminosäuren erfaßt. Man läuft somit Gefahr, bei der komplexen Zusammensetzung unserer Hydrolysate zu hohe Amino-Stickstoffwerte zu erzielen.

Die Berechtigung, trotzdem von der bei der Reaktion der Bakterienhydrolysate mit Ninhydrin entstehenden Farbstoffmenge auf den im Hydrolysat vorhandenen α-Amino-Stickstoff der Aminosäuren zu schließen, leiten wir aus der Tatsache her, daß die ninhydrinpositiven Komponenten der Hydrolysate nach vorheriger Trennung fast vollständig identifiziert worden sind. Wie später gezeigt werden wird, handelt es sich bei dem weitaus größten Teil der in diese Reaktion eingehenden ninhydrinpositiven Substanzen der Bakterienhydrolysate um von uns identifizierte Aminosäuren, die bereits von TROLL und CANNAN (1953) darauf untersucht worden sind, welche Ausbeut an DYDA sie in diesem speziellen Amino-N-Analyseverfahren liefern.

Wir glauben also, daß der Fehler bei der Berechnung der Amino-N-Werte und damit bei der Bestimmung der Gesamtaminosäuren der Bakterienhydrolysate nach Vernachlässigung anderer ninhydrinpositiver Substanzen nur geringfügig ist.

4. Chromatographie:

a) Herstellung der Schicht: Zur analytischen Dünnschichtchromatographie werden in der Regel 0,25 mm dicke Schichten benutzt (PATAKI, 1966). Als Sorptionsmittel kommt Kieselgel G zur Anwendung. Es werden 25 g Kieselgel G mit 50 ml Aqua destillata versetzt und im Mörser gut durchgemischt, so daß eine wässrige Suspension entsteht. Mit Hilfe eines Streichgerätes des "Stahl-Typs" (STAHL, 1958, 1962) wird nun die Aufschwemmung auf 20 x 20 cm große Glasplatten aufgebracht. Die Platten werden in waagerechter Lage über Nacht an der Luft getrocknet (PATAKI, 1966; KELEMEN und PATAKI, 1963).

b) Auftragung der Substanzproben: Die Hydrolysatportionen werden mit der für quantitative Bestimmungen geeigneten Hamilton-Mikrodosierspritze mit Skaleneinteilung 1 - 10 mm^3 2 cm von den Plattenrändern entfernt aufgetragen. Das Auftragsvolumen wird so in kleinsten Portionen unter jeweiliger Zwischentrocknung mit einem Föhn auf das Sorptionsmittel getropft, daß die Substanzmenge auf möglichst kleinem Raum ausgebreitet ist (PATAKI, 1966).

c) Entwicklung der Chromatogramme: Für die aufsteigende Chromatographie verwenden wir das von BRENNER und NIEDERWIESER (1961) und auch später von STAHL (1962) beschriebene S-Kammersystem, welches dem Trogkammerverfahren mit Kammersättigung gegenüber den Vorzug des verringerten Fließmittelverbrauches zur Sättigung des Gasraumes bietet. Eine zusätzliche Kammersättigung der S-Kammer bringt nach unseren Erfahrungen mit der benutzten Fließmittelkombination keine merkbaren Vorteile.

Als Distanzstück zwischen der beschichteten Platte und der Deckplatte dient ein Papprahmen. Diese von JÄNCHEN (1964) in die Chromatographie eingeführten Papprahmen sind aufgeschmolzenen Glasstreifen insoweit überlegen, als daß sie trotz geringer Sorptionsmittelreste auf den Auflageflächen wegen ihrer Elastizität einen dichteren Abschluß des Gasraumes ermöglichen.

Die Trennung eines so komplexen Aminosäuregemisches, wie es ein Bakterienhydrolysat darstellt, gelingt auf Kieselgel G-Schichten wie auf dünnen Schichten anderer Sorptionsmittel nur bei kombinierter Anwendung mehrerer Fließmittel. "Nach den bisherigen Erfahrungen hängt der Trennerfolg in erster Linie von der Auswahl des Fließmittels ab. Grundsätzliche Unterschiede zwischen anorganischen und organischen Schichten bestehen nicht" (PATAKI, 1966). Für die zweidimensionale Chromatographie der Aminosäuren eignet sich besonders die Kombination der Fließmittel Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1) mit Phenol/Wasser (75 : 25 g/g) sowie die Kombination von Chloroform/Methanol/17 %igem Ammoniak (2 : 2 : 1 v/v/v) mit Phenol/Wasser (75 : 25 g/g; zu je 100 g Fließmittel 20 mg NaCN) (BRENNER und NIEDERWIESER, 1960; BRENNER u.a., 1964; FAHMY u.a., 1961).

Wir bevorzugen die kombinierte Anwendung von Chloroform/Methanol/17 %igem Ammoniak in der ersten und Phenol/Wasser in der zweiten Dimension, da bei dieser Fließmittelkombination alle im Bakterienhydrolysat vorhandenen Aminosäuren mit Ausnahme von Leucin und Isoleucin mit ausreichender Genauigkeit getrennt werden. Vor allem zeigen die quantitativ zu bestimmenden Aminosäuren Arginin, Phenylalanin, Cysteinsäure und Methioninsulfon klar von den benachbarten Aminosäuren abgegrenzte Flecken. Außerdem stehen zur Überprüfung der mit Hilfe von Mischchromatogrammen erreichten eigenen Identifizierung des Fleckenmusters für diese Fließmittelkombination bereits mehrere Fleckenkarten zur Verfügung (FAHMY u.a., 1961; NEU, 1963; HUBER u.a., 1963; ROKKONES, 1964; MICHL und BACHMEYER, 1964; FRENTZ, 1965).

Die Chromatographie erfolgt aufsteigend und zweidimensional ohne zusätzliche Kammersättigung. Nach der ersten und zweiten Dimension trocknet man die Platte 10 min. bei 110°C im Trockenschrank (ROKKONES, 1964). Die Zwischentrocknungsbedingungen sind zu standardisieren (PATAKI, 1966). Die Laufstrecke (Strecke vom Auftragspunkt bis zur maximalen Fließmittelsteighöhe) beträgt in beiden Laufrichtungen 15 cm.

d) Qualitative Erfassung der Aminosäuren im Hydrolysat: Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgt mit Hilfe von Mischchromatogrammen. Es werden zu diesem Zweck auf eine Kieselgel G-Platte mit 5 mm^3 des Bakterienhydrolysates 10 Gamma der Testaminosäure (Lösung in 0,1 n HCl) aufgetragen. Auf eine zweite Platte werden nur 5 mm^3 des Bakterienhydrolysates aufgebracht. Beide Platten werden unter den gleichen Bedingungen zweidimensional chromatographiert. Wenn der Fleck auch in längeren Mischchromatogrammen mit den beiden Fließmitteln einheitlich bleibt, so sind die untersuchten Substanzen identisch (ROMAHN, 1961; FRENTZ, 1965).

Die Revelation der ninhydrinpositiven Substanzen auf Kieselgel G - Platten wird nach BRENNER u.a. (1962) nach sorgfältiger Trocknung der Schicht durch Besprühung mit einer Ninhydrinlösung (0,3 g Ninhydrin + 100 ml Butanol + 3 ml Eisessig) erreicht. Man hält die Platte über eine Heizfläche und markiert die nun fast punktförmig erscheinenden Farbflecken mit einem spitzen Bleistift. Anschließend erhitzt man die Platte 10 min. auf 110°C im Trockenschrank. (BRENNER und NIEDERWIESER, 1960).

e) Quantitative Erfassung der Aminosäuren Methioninsulfon, Cysteinsäure, Phenylalanin und Arginin: Für die quantitative Auswertung eines Dünnschichtchromatogrammes gibt es hauptsächlich 2 Methoden: 1. Auswertung in situ, 2. Auswertung nach Elution. Bei der Auswertung in situ kann die Konzentration eines Stoffes durch Vergleich seiner Fleckenfläche und/oder seiner Fleckenintensität mit denjenigen von Standardsubstanzen semiquantitati

bestimmt werden. Nach der von uns verwandten Methode von BARROLLIER (1957; 1961; 1964) werden die Aminosäure-Dünnschichtchromatogramme nach vorheriger Elution der Farbflecken durch die anschließende Kolorimetrie der Eluate quantitativ ausgewertet. Die Genauigkeit der Arbeitsweise wird mit $\pm$ 2 - 5 % angegeben.

Von jedem der vier Hydrolysate einer Bakterienart werden je vier quantitative Analysen der Aminosäuren Methioninsulfon, Cysteinsäure, Phenylalanin und Arginin vorgenommen. Die Auftragsmenge beträgt 15 mm^3 Bakterienhydrolysat. Die Chromatographie erfolgt, wie zuvor beschrieben, aufsteigend im S-Kammersystem mit Chloroform/Methanol/17 %igem Ammoniak in der ersten und Phenol/Wasser in der zweiten Dimension. Nach Trocknung werden die Aminosäureflecken mit Hilfe einer Reagenzlösung, die aus 100 mg Cadmiumacetat + 10 ml H_2O + 5 ml Eisessig + 100 ml Aceton + 1g Ninhydrin besteht, sichtbar gemacht. Durch den Zusatz von Cadmiumacetat zu diesem Ninhydrinreagenz wird eine Stabilisierung des entstehenden Farbkomplexes erreicht. "Somit wird der entstehende Farbstoff gewissermaßen in statu nascendi in die Metallkomplexverbindung überführt. Die Hemmung der Farbstoffbildung durch anwesende Metallionen fällt bei genügend kleiner Cadmiumkonzentration nicht mehr ins Gewicht" (BARROLLIER, 1955). 50 ml der Lösung werden auf eine waagerecht liegende, 20 x 20 cm große Platte möglichst gleichmäßig versprüht. Durch diesen großen Reagenzüberschuß wird die Abhängigkeit der entstehenden Farbstoffmenge von der Reagenzmenge unterdrückt. Anschließend erfolgt 24 Std. lang die Entwicklung der Farbflecken bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluß. Durch Verzicht auf eine schnellere Farbstoffbildung bei höherer Temperatur wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse stark verbessert.

Die zu bestimmenden Aminosäuren sind durch ihre charakteristische, sehr gut reproduzierbare Lagerung im Fleckenmuster gekennzeichnet. Die betreffenden Aminosäureflecken werden mit einer spitzen Nadel umfahren und dann mit einer 4 %igen Kollodiumlösung angefeuchtet, so daß die Farbflecken vollständig

in das Kollodium eingebettet werden. Nach Trocknung kann das Kollodiumplättchen mit dem eingeschlossenen Farbfleck ohne Schwierigkeiten quantitativ abgehoben werden.

Zur Elution des Farbfleckes dient schwermetallfreies Methanol (Uvasol - Methanol "Merck", Darmstadt), welches 3 % Eisessig und 0,05 % Cadmiumacetat enthält. Jedes Farbplättchen wird in ein Zentrifugierröhrchen gegeben. Dann pipettiert man je 2,5 ml Elutionsmittel hinzu. Das Kollodium löst sich ohne Rückstand auf. Nach Abzentrifugieren des Schichtmaterials (20 min. bei 6000 Umdrehungen pro Minute) wird in 1 cm - Küvetten bei 492 nm gegen das Elutionsmittel als Nullwert photometriert.

An Hand von Eichkurven, die aufgestellt wurden, indem wir bekannte Lösungen von Cysteinsäure, Methioninsulfon, Phenylalanin und Arginin in 0,1 n HCl unter den gleichen Bedingungen wie später die Bakterienhydrolysate in verschiedenen Konzentrationen auf Kieselgel G - Platten auftrugen, chromatographierten, eluierten und photometrierten, kann dann die aufgetragene Menge Aminosäure bestimmt werden. Unter Berücksichtigung des Auftragsvolumens und der Einwaage an Bakterientrockensubstanz läßt sich nun die prozentuale Aminosäuremenge in der Bakterientrockensubstanz berechnen.

Zwischen Aminosäuremenge und Extinktion besteht eine lineare Beziehung. (BARROLLIER, 1964). Die erzielten Eichkurven der Aminosäuren sind geradlinig und befolgen streng das LAMBERT-BEER`sche Gesetz (BARROLLIER, 1955; 1961).

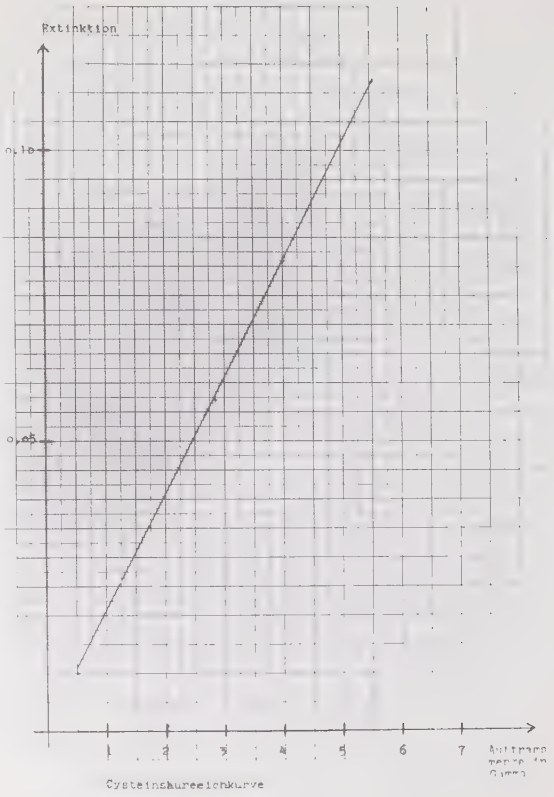

Abb. Nr. 3 : Cysteinsäureeichkurve

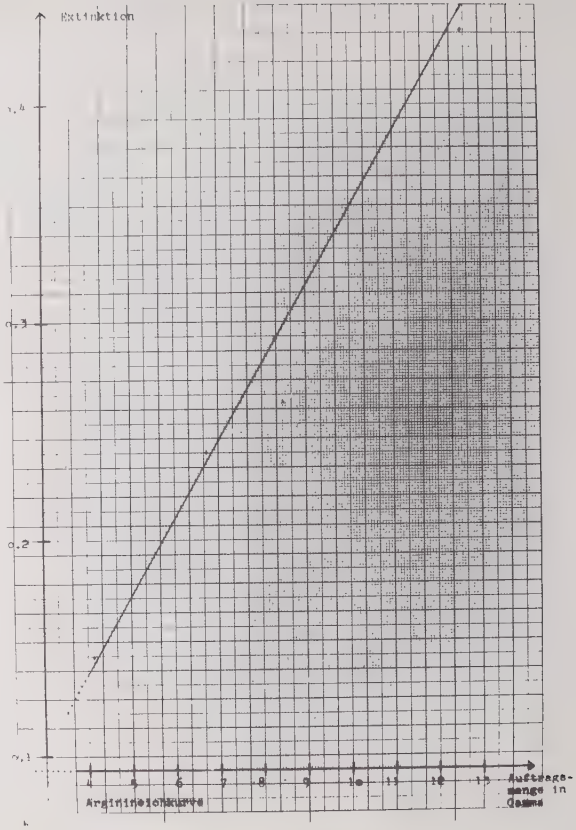

Abb. Nr. 2 : Argininеichkurve

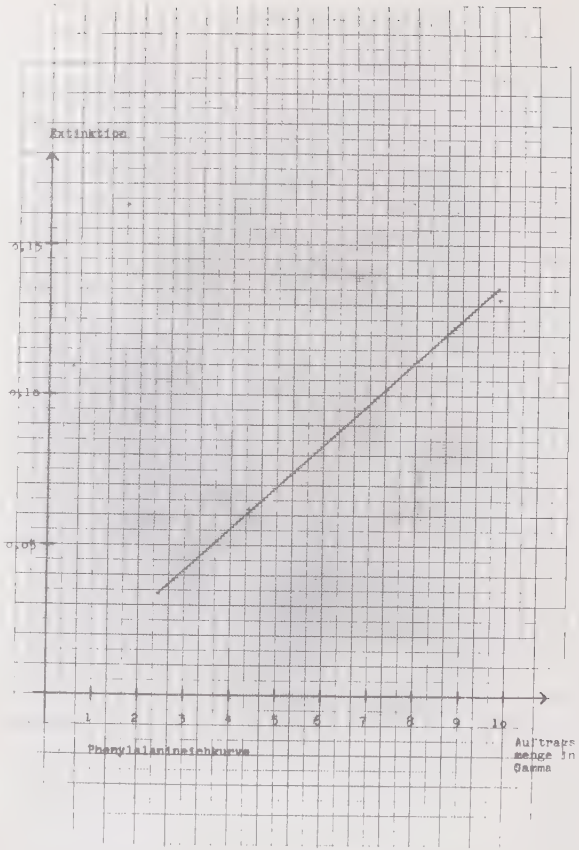

Abb. Nr. 5: Phenylalanineichkurve

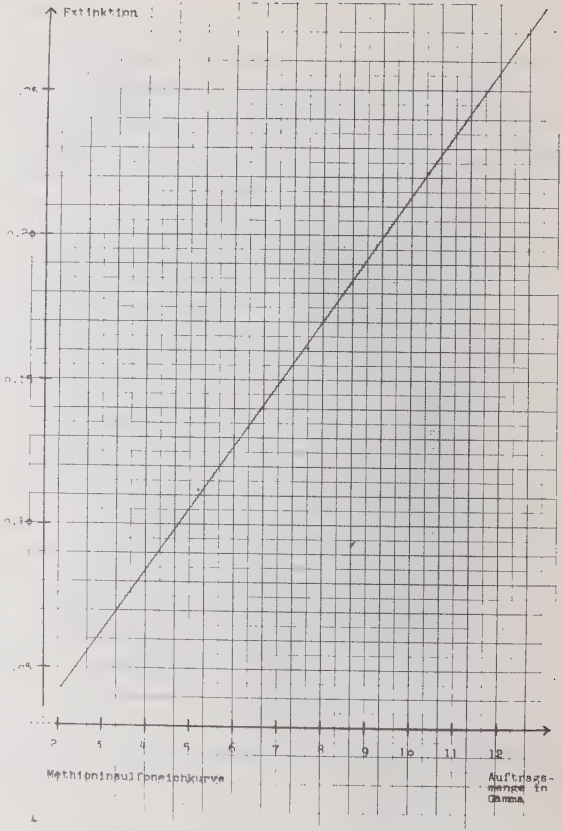

Abb. Nr. 4: Methioninsulfoneichkurve

D. Ergebnisse

Die in den Hydrolysaten der untersuchten Bakterien nachzuweisenden Aminosäuren sind in Tabelle Nr. 2 aufgeführt. Über ihre Lage im Chromatogramm geben die Abbildungen Nr. 6 - 11 Auskunft.

Die Aminosäuren Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Cysteinsäure, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Hydroxylysin, Hydroxyprolin, Leucin und Isoleucin, Lysin, Methioninsulfon, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin und Valin lassen sich in allen Bakterienhydrolysaten nachweisen. Unterschiedliches Verhalten zeigen die Bakterienhydrolysate bei den Aminosäuren γ-Aminobuttersäure, welche nur im Hydrolysat von Cl. sporogenes zu finden ist, und Tryptophan, das allein in den Hydrolysaten von Cl. perfringens und Cl. sporogenes in nachweisbaren Mengen vorliegt. Ornithin läßt sich nur in den Hydrolysaten von E. coli, Cl. perfringens und Cl. sporogenes, nicht aber in den Hydrolysaten von Bac. subtilis und Ps. aeruginosa nachweisen.

2 ninhydrinpositive Flecken bleiben unidentifiziert. Davon ist die Substanz Nr. 2 in allen Bakterienhydrolysaten mit Ausnahme der Hydrolysate von E. coli, die Substanz Nr. 1 in den Hydrolysaten von Cl. perfringens, Cl. sporogenes, E. coli und Ps. aeruginosa, nicht aber im Hydrolysat von Bac. subtilis zu finden.

In der von ROKKONES (1964) veröffentlichten Fleckenkarte hat Phosphoäthanolamin eine ähnliche Lage im Chromatogramm wie die Substanz Nr. 1. Mischchromatogramme mit der genannten Verbindung ergaben jedoch keine sichere Übereinstimmung.

Tabelle Nr. 2
Eigene Ergebnisse
Nachweisbare Aminosäuren in den Hydrolysaten

Nr.	Aminosäuren	E. coli (aerob gez.)	E. coli (anaerob gez.)	Cl. sporogenes	Cl. perfringens	Ps. aeruginosa	Bac. subtilis
12	Alanin	+	+	+	+	+	+
13	γ-Aminobuttersäure	0	0	+	0	0	0
5	Arginin	+	+	+	+	+	+
7	Asparaginsäure	+	+	+	+	+	+
9	Cysteinsäure	+	+	+	+	+	+
8	Glutaminsäure	+	+	+	+	+	+
11	Glycin	+	+	+	+	+	+
17	Histidin	+	+	+	+	+	+
6	Hydroxylysin	+	+	+	+	+	+
14	Hydroxyprolin	+	+	+	+	+	+
21	Leucin + Isoleucin	+	+	+	+	+	+
4	Lysin	+	+	+	+	+	+
18	Methioninsulfon	+	+	+	+	+	+
3	Ornithin	+	+	+	+	0	0
22	Phenylalanin	+	+	+	+	+	+
15	Prolin	+	+	+	+	+	+
10	Serin	+	+	+	+	+	+
16	Threonin	+	+	+	+	+	+
20	Tyrosin	+	+	+	+	+	+
23	Tryptophan	0	0	+	+	0	0
19	Valin	+	+	+	+	+	+
1	Substanz Nr. 1	+	+	+	+	+	0
2	Substanz Nr. 2	0	0	+	+	+	+

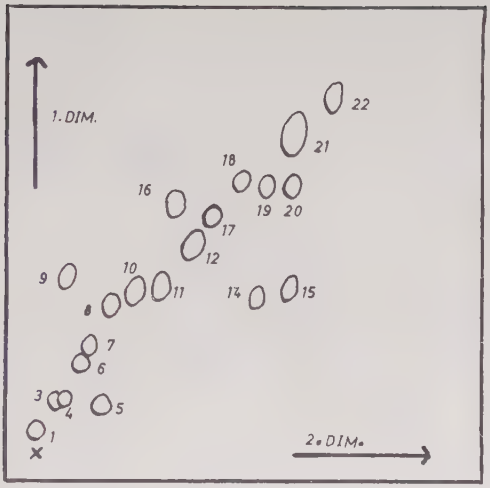

Abb. Nr. 6 : Dünnschichtchromatogramm des Hydrolysates von E. coli

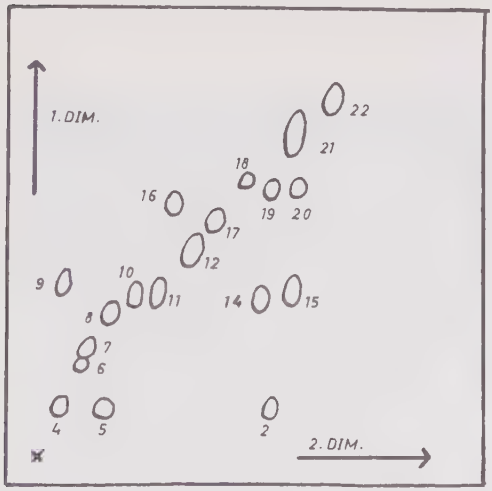

Abb. Nr. 7 : Dünnschichtchromatogramm des Hydrolysates von Bac. subtilis

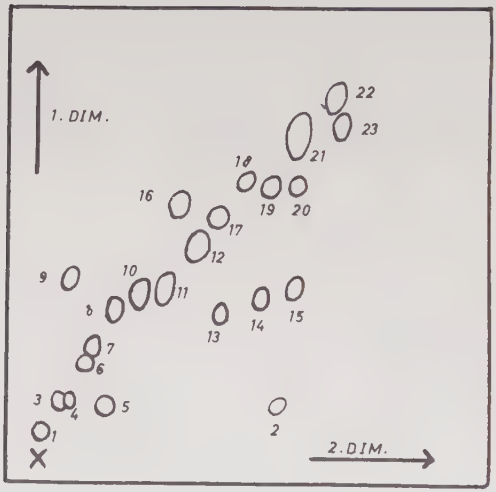

Abb. Nr. 8 : Dünnschichtchromatogramm des Hydrolysates von Cl. sporogenes

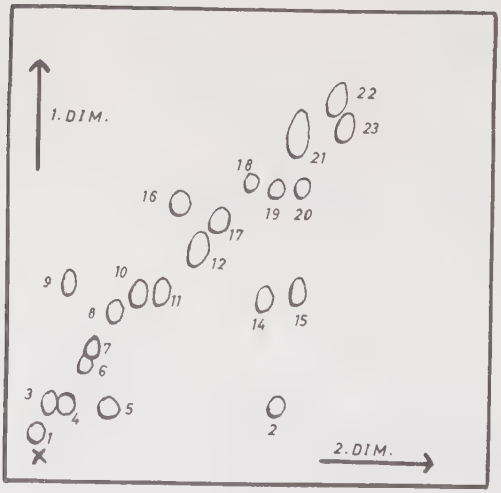

Abb. Nr. 9 : Dünnschichtchromatogramm des Hydrolysates von Cl. perfringens

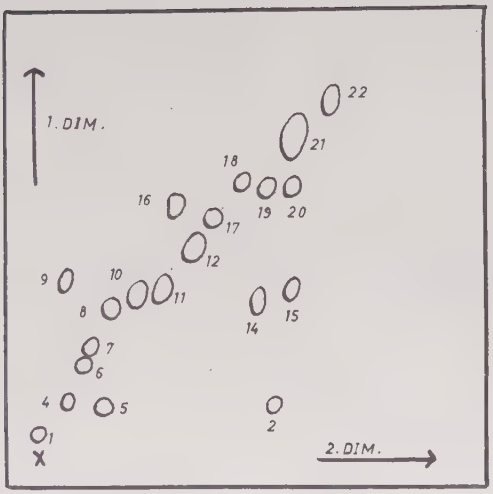

Abb. Nr. 10 : Dünnschichtchromatogramm des Hydrolysates von Ps. aeruginosa

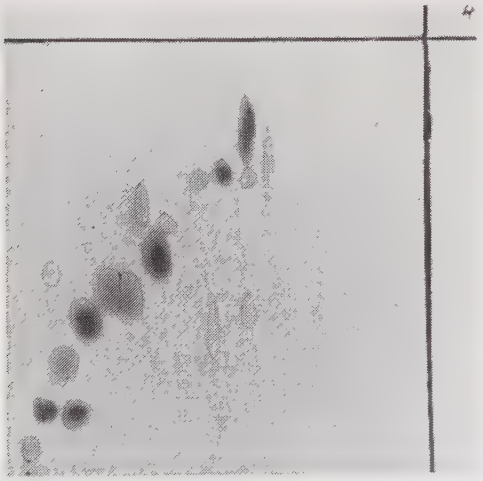

Abb. Nr. 11 : Dünnschichtchromatogramm des Hydrolysates von E. coli; Auftragsmenge 4 mm^3; Ninhydrinfärbung nach BRENNER u.a. (1962)

Eine Übersicht über die quantitative Verteilung der Aminosäuren Arginin, Phenylalanin, Cysteinsäure und Methioninsulfon sowie des Amino-N-Gehaltes in den Hydrolysaten der untersuchten Bakterienarten gibt die Tabelle Nr. 3. Die Aminosäure- und Amino-N-Werte der Bakterienhydrolysate sind dort in Prozent der Bakterientrockensubstanz angegeben.

Um zu prüfen, inwieweit ein Aminosäureunterschied zwischen den einzelnen Bakterienarten statistisch zu sichern ist, werden die Aminosäurewerte aller untersuchten Bakterien mit Hilfe des WILCOXON-Signifikanztestes (DOCUMENTA GEIGY, 1960) miteinander verglichen. Der WILCOXON-Signifikanztest macht keinerlei Voraussetzung hinsichtlich der Gestalt der Bevölkerung, fordert jedoch die Stetigkeit der Verteilung und liefert die geforderte zweiseitige Signifikanzwahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$. Über die Ergebnisse der statistischen Auswertung gibt die Tabelle Nr. 4 Auskunft. Eine weitere Tabelle Nr. 5 beschreibt den Gesamtgehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren pro Amino-Stickstoff für jedes Bakterienhydrolysat, bezogen auf den Wert von Bac. subtilis, der gleich 1 gesetzt wird.

Tabelle Nr. 3
Eigene Ergebnisse (in Prozent der Bakterientrockensubstanz)

	Amino-N	Cysteinsäure	Methioninsulfon	Arginin	Phenylalanin
E. coli (aerob gezüchtet):					
Hydrolysat 1	7,4	0,8	2,2	3,1	2,3
2	7,8	1,1	2,3	2,9	2,2
3	7,5	1,1	2,5	3,2	2,1
4	7,2	0,9	2,0	3,1	2,1
Mittelwert	7,4	0,9	2,2	3,0	2,1
E. coli (anaerob gezüchtet):					
Hydrolysat 1	7,6	1,2	3,7	3,4	2,5
2	7,9	1,6	3,6	3,6	3,2
3	8,1	1,1	3,6	3,4	2,8
4	7,6	1,3	3,1	3,2	2,9
Mittelwert	7,8	1,3	3,5	3,4	2,8
Ps. aeruginosa:					
Hydrolysat 1	7,5	1,0	2,7	4,2	2,3
2	6,8	0,7	2,0	4,1	2,3
3	7,6	0,6	2,5	3,5	2,8
4	7,2	0,6	2,3	3,3	2,6
Mittelwert	7,2	0,7	2,3	3,7	2,5
Bac. subtilis:					
Hydrolysat 1	7,1	0,2	1,4	2,3	1,1
2	6,8	0,4	1,3	2,7	1,0
3	7,3	0,4	1,6	2,5	1,4
4	7,3	0,3	1,5	2,9	1,3
Mittelwert	7,0	0,3	1,4	2,6	1,2
Cl. sporogenes:					
Hydrolysat 1	8,1	1,0	2,9	1,5	1,4
2	8,5	1,0	2,6	1,7	1,4
3	9,0	1,7	3,2	2,0	1,9
4	8,4	1,2	3,2	2,3	1,2
Mittelwert	8,5	1,2	2,9	1,8	1,4

	Amino-N	Cysteinsäure	Methioninsulfon	Arginin	Phenylalanin
Cl. perfringens:					
Hydrolysat 1	6,8	1,3	2,3	1,7	1,0
2	7,2	0,9	2,5	1,5	1,0
3	7,1	1,3	2,3	1,7	1,3
4	7,2	1,7	2,6	1,9	1,5
Mittelwert	7,0	1,3	2,4	1,7	1,2

Tabelle Nr. 4
Ergebnisse des WILCOXON-Signifikanztestes
(Signifikanzwahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$)

	Unterschied Cysteinsäure	Unterschied Methioninsulfon	Unterschied Arginin	Unterschied Phenylalanin
E. coli (aerob gezüchtet) / E. coli (anaerob gez.)	nicht zu sichern	signifikant	nicht zu sichern	signifikant
Cl. sporogenes / Cl. perfringens	nicht zu sichern	nicht zu sichern	nicht zu sichern	nicht zu sichern
Bac. subtilis / Ps. aeruginosa	signifikant	signifikant	signifikant	signifikant
Bac. subtilis / Cl. sporogenes	signifikant	signifikant	nicht zu sichern	nicht zu sichern
Bac. subtilis / Cl. perfringens	signifikant	signifikant	signifikant	nicht zu sichern
Bac. subtilis / E. coli (anaerob gez.)	signifikant	signifikant	signifikant	signifikant
Bac. subtilis / E. coli (aerob gezüchtet)	signifikant	signifikant	nicht zu sichern	signifikant
Ps. aeruginosa / Cl. sporogenes	nicht zu sichern	nicht zu sichern	signifikant	signifikant
Ps. aeruginosa / Cl. perfringens	nicht zu sichern	nicht zu sichern	signifikant	signifikant
Ps. aeruginosa / E. coli (anaerob gez.)	signifikant	signifikant	nicht zu sichern	nicht zu sichern
Ps. aeruginosa / E. coli (aerob gezüchtet)	nicht zu sichern	nicht zu sichern	signifikant	nicht zu sichern
E. coli (aerob gezüchtet) / Cl. sporogenes	nicht zu sichern	signifikant	signifikant	signifikant
E. coli (aerob gezüchtet) / Cl. perfringens	nicht zu sichern	nicht zu sichern	signifikant	signifikant
E. coli (anaerob gez.) / Cl. sporogenes	nicht zu sichern	nicht zu sichern	signifikant	signifikant
E. coli (anaerob gez.) / Cl. perfringens	nicht zu sichern	signifikant	signifikant	signifikant

Tabelle Nr. 5
Eigene Ergebnisse
Gesamtgehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren pro Amino-Stickstoff, bezogen auf den Wert von Bacillus subtilis.

	Summe der S-haltigen Aminosäuren in % der Bakterientrockensubstanz	Amino-N in % der Bakterientrockensubstanz	S-haltige Aminosäuren pro Amino-N	S-haltige Aminosäuren pro Amino-N, bezogen auf den Wert von Bac. subtilis
Bac. subtilis	1,7	7,0	0,24	1,00
Ps. aeruginosa	3,0	7,2	0,41	1,70
E. coli (aerob gez.)	3,1	7,4	0,41	1,70
Cl. sporogenes	4,1	8,5	0,48	2,00
Cl. perfringens	3,7	7,0	0,52	2,16
E. coli (anaerob gez.)	4,8	7,8	0,61	2,54

E. Vergleich und Diskussion

Bei unseren Untersuchungen finden wir fast alle die Aminosäuren, die von KANDLER und ZEHENDER (1956) zur allgemeinen Grundstruktur der Bakterien gezählt werden: Glutaminsäure, Glycin, Valin, Arginin, Asparaginsäure, Lysin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Prolin, Tyrosin, Histidin und Cystin (als Cysteinsäure). Tryptophan ist in nachweisbaren Mengen nur in den Hydrolysaten von Cl. perfringens und Cl. sporogenes vorhanden. Leucin, welches ebenfalls zu der "Grundstruktur" gehört, kann mit der benutzten Fließmittelkombination nicht sicher von Isoleucin getrennt werden. Daneben finden sich noch bei allen von uns untersuchten Bakterienarten Alanin, Hydroxyprolin, Hydroxylysin und Methionin (als Methioninsulfon).

POLSON (1948), KANDLER und ZEHENDER (1956) und ANDERSON, RHODES u.a. (1958) können im Hydrolysat von E. coli eine geringe Menge Tryptophan nachweisen, während hingegen der Nachweis dieser Aminosäure in unseren Hydrolysaten nicht gelungen ist. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen weisen STOKES und GUNNES (1946) auch bei Bac. subtilis und MONDOLFO und HOUNIE (1951) bei Ps. aeruginosa Tryptophan nach. Eine Begründung dafür, daß Tryptophan in nachweisbaren Mengen nur in den Hydrolysaten der beiden Clostridien und nicht in den Hydrolysaten der übrigen drei Bakterienarten zu finden ist, könnte in der vollständigen Zerstörung einer nur geringen, jedoch im Bakterienprotein ursprünglich vorhandenen Tryptophanmenge durch die von uns gewählte Hydrolyseart gefunden werden. Dieser Befund spricht dafür, daß die beiden Clostridien große Tryptophanmengen in ihrer Leibessubstanz besitzen, die auch durch eine salzsaure Hydrolyse nicht vollständig zerstört werden können.

RYMKIEWICZ (1959; 1960) konnte in den vegetativen Zellen von Cl. perfringens und Cl. sporogenes kein Tyrosin und Methionin nachweisen, während dieser Nachweis bei unseren Hydrolysaten dieser Bakterien durchaus zu führen ist.

Wir haben dagegen im Hydrolysat von Cl. sporogenes γ-Aminobuttersäure und in den Hydrolysaten beider Clostridien Hydroxylysin zusätzlich zu den von RYMKIEWICZ (1959; 1960) für die Leibessubstanz der Clostridien angegebenen Aminosäuren gefunden. Im übrigen sind in unseren Hydrolysaten alle Aminosäuren, die von diesem Autor für die Zusammensetzung der Clostridien als charakteristisch angesehen werden, vorhanden.

Der nach WORK (1957) bei allen Bakterien als ninhydrinpositive Substanz der Zellwände nachzuweisende Aminozucker Glucosamin konnte in keinem unserer Bakterienhydrolysate gefunden werden. Vielleicht war dieser Aminozucker deswegen in unseren Hydrolysaten nicht nachzuweisen, weil er durch die Perameisensäureoxydation der Bakterientrockensubstanz zerstört oder von irgendeiner anderen ninhydrinpositiven Substanz im Chromatogramm überlagert worden ist.
Die ninhydrinpositiven Bakterienzellwandsubstanzen α,ε -Diaminopimelinsäure (WORK und DEWEY, 1953) und Muraminsäure (WORK, 1961; 1962) konnten bei unserer Untersuchung nicht berücksichtigt werden, da die von WORK (1951) auf papierchromatographischer Grundlage angegebenen Vorschriften zum Nachweis der Diaminopimelinsäure nicht mit unserem Analysenverfahren in Übereinstimmung gebracht werden konnten und Vergleichssubstanzen für Mischchromatogramme nicht verfügbar waren. Möglicherweise befinden sich diese beiden Substanzen unter den Flecken, die von uns nicht identifiziert wurden.

Die ebenfalls in der Leibessubstanz (RYMKIEWICZ, 1959; 1960) und in den Zellwänden (PERKINS und CUMMINS, 1964; WORK, 1964; DUC-NGUYEN und WEED, 1964) verschiedener Bakterien nachgewiesene Aminosäure

Ornithin ist in sicher nachweisbaren Mengen nur in den Hydrolysaten der beiden Clostridien und von E. coli vorhanden. Da die Flecken Lysin und Ornithin im Chromatogramm bei der gewählten Fließmittelkombination sehr nahe beieinanderliegen, könnte diese Aminosäure bei nur geringem Ornithingehalt des Hydrolysates in dem intensiven Lysinfleck untergegangen sein.

Im allgemeinen sind, wie auch aus unseren Untersuchungen zu ersehen ist, die Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der Bakterieneiweiße mehr quantitativer als qualitativer Natur (ROMAHN, 1961).

Hinsichtlich der quantitativen Daten erlauben nur wenige Veröffentlichungen einen Vergleich, zumal da der quantitative Cystein/Cystingehalt von Bakterien sehr selten untersucht worden ist und unseres Wissens bis auf die Arbeit von KISHINO (1930), der den Cystingehalt des Bakterienproteins von Cl. perfringens und Cl. sporogenes sowie von E. coli, Vibrio cholerae und M. tuberculosis bestimmte, keine Untersuchungen über den quantitativen Aminosäuregehalt der Leibessubstanz von Cl. perfringens und Cl. sporogenes existieren.

Die quantitativen Werte für die Aminosäurezusammensetzung der untersuchten Bakterienarten, die in der Literatur bekannt geworden sind, sind zum Vergleich mit den eigenen Ergebnissen in der Tabelle Nr. 6 zusammengestellt. Trotz der nicht miteinander vergleichbaren Wachstumsbedingungen der Bakterien und der unterschiedlichen analytischen Methodik bei den einzelnen Autoren zeigen die von uns erzielten quantitativen Ergebnisse hinreichende Übereinstimmung mit den Werten, die in Tabelle Nr. 6 aus Literaturstellen zitiert sind. Im allgemeinen liegen jedoch unsere Angaben über den Methioningehalt der untersuchten Bakterien höher als bei den aufgeführten Autoren. Wir führen dieses Verhalten auf die durch die Perameisenoxydation der Bakterientrockensubstanz erzielte Überführung von Methionin in sein Sulfon und seine damit verbesserte Hydrolysestabilität zurück. Wahrscheinlich ist so der Verlust an Methionin bei der Hydro-

lyse geringer als bei den zum Vergleich herangezogenen Autoren.

KISHINO (1930) findet nach Bestimmung des Cystingehaltes der Aerobier E. coli, V. cholerae und M. tuberculosis sowie der Anaerobier Cl. perfringens und Cl. sporogenes unter Verwendung des OKUDA-Analyseverfahrens mit Jod bei den Anaerobiern einen höheren Gehalt an Cystin als bei den von ihm untersuchten Aerobiern. Der Autor kann im Protein von E. coli kein Cystin, im Protein von M. tuberculosis 0,105 %, von V. cholerae 0,144 %, dagegen im Protein von Cl. perfringens 0,872 % und von Cl. sporogenes 0,896 % Cystin nachweisen.

Unsere Werte für den Cystin/Cysteingehalt der gesamten Bakterienleibessubstanz nach Trocknung und bei Bestimmung als Cysteinsäure liegen für Cl. perfringens bei 1,3 % und für Cl. sporogenes bei 1,2 % im Mittel, also insgesamt etwas höher als bei KISHINO (1930). In der Leibessubstanz von E. coli können wir 0,9 % Cystin/Cystein als Cysteinsäure bei aerober und 1,3 % bei anaerober Züchtung des Keimes nachweisen. MONDOLFO und HOUNIE (1951) bestimmen den Cystingehalt im Protein von E. coli mit 1,8 - 2,4 %. Dagegen kommen ECKSTEIN und SOULE (1931) und KANDLER und ZEHENDER (1956) wie KISHINO (1930) zu dem Ergebnis, E. coli enthalte kein Cystin. Die Mittelwerte für den Cystin/Cysteingehalt der anaerob gezüchteten Keime liegen bei uns wie bei KISHINO (1930) höher als die Mittelwerte der aerob gezüchteten Bakterien. Jedoch ist dieser Unterschied nicht durchgehend signifikant.

Tabelle Nr. 6
Vergleich der Ergebnisse

	POLSON (1948) in % des Gesamteiweißes	MONDOLFO u. HOUNIE (1951) in % des Proteins	ANDERSON, RHODES u.a. (1958) in g/16 g N	STOKES u. GUNNES (1946) in % des Trockengewichtes	DUNLOP (1949) in % des Trockengewichtes	SCHREIER u. RUTHE (1955) in % des Trockengewichtes	REUSSER u.a. (1957) in % des Trockengewichtes	eigene Ergebnisse in % des Trockengewichtes	
E. coli:									
Arginin	5,4-5,8	4,5-6,5		4,3	3,0-3,3	3,0-3,3		3,0-3,4	
Phenylalanin	3,0-3,4	1,2-1,8		2,7	2,0-2,1	2,0-2,5		2,1-2,8	
Methionin	2,0-2,1	0,4-1,0	0,9-2,0	1,7	1,2-1,5	1,2-1,5		2,2-3,5	+
Cystin		1,8-2,4						0,9-1,3	+
Ps. aeruginosa:									
Arginin		4,6					5,0	3,7	
Phenylalanin		3,2					2,2	2,5	
Methionin		0,48	1,9				1,6	2,3	+
Cystin		3,8						0,7	+
Bac. subtilis:									
Arginin				2,4			2,4	2,6	
Phenylalanin				2,2			2,2	1,2	
Methionin			2,0	1,0			1,2	1,4	+
Cystin								0,3	+

mikrobiol. Methodik: SCHREIER u.a.; DUNLOP; ANDERSON u.a.; STOKES u.a.; MONDOLFO u.a.;
papierchrom. Methodik: POLSON; REUSSER u.a.;

+ Cysteinsäure- bzw. Methioninsulfonwerte

Vergleicht man die untersuchten Bakterien untereinander, so zeigen die beiden Angehörigen der Gattung Clostridium und anaeroben Sporenbildner Cl. perfringens und Cl. sporogenes eine weitgehende Übereinstimmung in ihrem Gehalt an Phenylalanin, Arginin, Methionin und Cystein/Cystin. Beim Vergleich dieser beiden anaeroben Sporenbildner mit dem aeroben Sporenbildner Bac. subtilis, welcher wie die Clostridien der Familie der Bacillaceae angehört, fällt der signifikant niedrigere Cystein/Cystin- und Methioningehalt von Bac. subtilis auf. Jedoch weist Bac. subtilis, verglichen mit Ps. aeruginosa und E. coli, den gleichen signifikanten Unterschied auch diesen Bakterien gegenüber auf. Bac. subtilis besitzt also von allen untersuchten Bakterienarten den signifikant geringsten Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren in seiner gesamten Leibessubstanz.

Ins Auge fällt weiter, daß der Stamm von E. coli, der anaerob gezüchtet wurde, signifikant mehr Methionin und Phenylalanin enthält als der aerob gezüchtete Stamm. Was den Cystein/Cystin- und Argiringehalt anbetrifft, so ist hier ein Unterschied statistisch nicht zu sichern.

Eine weitere Möglichkeit zur Interpretation unseres Untersuchungsergebnisses ergibt sich, wenn man den Methioninsulfon- und Cysteinsäuregehalt eines Bakterienhydrolysates summiert und diese Summe zum gemessenen Amino-Stickstoff des Hydrolysates in ein Verhältnis setzt. Die so erzielten Quotienten werden auf den Wert für Bac. subtilis, der gleich 1 gesetzt wird, bezogen, weil dieser am niedrigsten ist. Man kann so die 6 untersuchten Bakterienstämme nach ihrem Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren pro Amino-Stickstoff ordnen (Tabelle Nr. 5).

Den geringsten Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren pro Amino-Stickstoff besitzt Bac. subtilis. Es folgen Ps. aeruginosa und der aerob gezüchtete Coli-Stamm. Dieser Gruppe der "Aerobier" schließen sich die "Anaerobier" Cl. sporogenes, Cl. perfringens und E. coli (anaerob gezüchtet) mit insgesamt höherem Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren an.

Nach unseren Ergebnissen scheint also die "anaerobe" Gruppe zumindest der 6 von uns analysierten Bakterienstämme einen größeren Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren in ihrem mit Ninhydrin bestimmbaren Gesamtaminosäurebestand der Bakterienzelle zu besitzen als die "aerobe".

Da keine Abtrennung der Zellwände oder anderer Bakterienzellbestandteile, sondern eine Aminosäureanalyse der Gesamtzellsubstanz vorgenommen wurde, ist eine Aufgliederung des Aminosäuregehaltes der Gesamtzelle nach einzelnen Zellorganen und Zellstrukturen und damit der Versuch einer Begründung für die gefundenen Aminosäureunterschiede nicht möglich.

Es bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten, dieses mit einer verhältnismäßig geringen Zahl analysierter Bakterien erzielte Ergebnis nachzuprüfen und eventuell zu verallgemeinern.

F. Zusammenfassung

Es werden je 4 Kulturen von Cl. sporogenes, von Cl. perfringens, eines aerob und eines anaerob gezüchteten Stammes E. coli, von Bac. subtilis und von Ps. aeruginosa auf ihre qualitative Aminosäurezusammensetzung und auf ihren quantitativen Gehalt an Cystein/Cystin, Methionin, Arginin und Phenylalanin untersucht. Als gemeinsames Nährsubstrat aller Bakterienarten dient das "standard culture medium for general bacteriology" von MARSHALL und KELSEY (1960). Cl. sporogenes und Cl. perfringens werden streng anaerob, Bac. subtilis und Ps. aeruginosa aerob und E. coli sowohl aerob als auch anaerob gezüchtet. Nach Erreichen der größten Wachstumsdichte wird vom flüssigen Nährboden abzentrifugiert, gewaschen und anschließend lyophilisiert. Die dann genau eingewogene Bakterientrockensubstanz wird mit Hilfe einer Perameisensäurelösung zur Umwandlung von Cystein/Cystin in Cysteinsäure und von Methionin in sein Sulfon oxydiert und dann in 6n HCl für 18 Stunden im Bombenrohr hydrolysiert.

Der Gesamtaminosäuregehalt der Hydrolysate wird mit Ninhydrin nach der kolorimetrischen Methode von TROLL und CANNAN (1953) bestimmt. Die Identifizierung der Aminosäuren in den Hydrolysaten erfolgt mit Hilfe der zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G-Schichten durch Mischchromatogramme mit Testaminosäuren. Als Fließmittel werden Chloroform/Methanol/17 %iges Ammoniak (2 : 2 : 1 v/v/v) in der ersten Dimension und Phenol/Wasser (75 : 25 g/g) in der zweiten Dimension verwendet (FAHMY u.a., 1961). Es lassen sich nach Revelation mit einem Ninhydrinreagenz folgende Aminosäuren in allen Bakterienhydrolysaten nachweisen: Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Cysteinsäure, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Hydroxyprolin, Hydroxylysin, Leucin und Isoleucin, Lysin, Methioninsulfon, Prolin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tyrosin und Valin. Tryptophan konnte nur bei Cl. sporogenes

und Cl. perfringens, γ-Aminobuttersäure nur bei Cl. sporogenes und Ornithin nur bei E. coli, Cl. perfringens und Cl. sporogenes nachgewiesen werden. 2 Flecken bleiben unidentifiziert. Davon ist die eine Substanz in allen Bakterienhydrolysaten mit Ausnahme des Hydrolysates von E. coli, die andere in den Hydrolysaten von E. coli, Ps. aeruginosa, Cl. perfringens und Cl. sporogenes, nicht aber bei Bac. subtilis zu finden. Im großen und ganzen sind die Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung der Bakterien aber mehr quantitativer als qualitativer Natur. Zur Bestimmung der quantitativen Gehalte der Bakterienhydrolysate an Methioninsulfon, Cysteinsäure, Arginin und Phenylalanin kommt die Methodik der Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen nach Elution in der von BARROLLIER (1957; 1961; 1964) beschriebenen Form zur Anwendung. Die Dünnschichtplatten werden mit einem Ninhydrin-Cadmium-Reagenz besprüht. Nach der 24 Stunden dauernden Farbentwicklung bei Zimmertemperatur werden die Flecken mit Kollodium beträufelt, nach Trocknung abgehoben und in 2,5 ml einer cadmiumhaltigen Methanollösung eluiert. Nach Abzentrifugieren des Schichtmaterials wird bei 492 nm photometriert. Die Ergebnisse werden unter Einbeziehung der ~~der~~ Auftragsmenge mit Hilfe vorher erstellter Eichkurven auf Prozent der Bakterientrockensubstanz berechnet. Die Genauigkeit dieser Methodik wird mit $\pm$ 2-5 % angegeben. Die Ergebnisse werden unter Anwendung des WILCOXON-Signifikanztestes (DOCUMENTA GEIGY, 1960) statistisch untersucht. Eine weitgehende Übereinstimmung in ihrem Gehalt an Phenylalanin, Arginin, Methionin und Cystein/Cystin zeigen die beiden Clostridien. Weiter fällt der allen anderen untersuchten Bakterienarten gegenüber signifikant niedrigere Cystein/Cystin- und Methioningehalt von Bac. subtilis auf ($p \leq 0,05$).

Das Hydrolysat des anaerob gezüchteten Stammes E. coli enthält mehr Methioninsulfon als dasjenige des aerob gezüchteten ($p \leq 0,05$).
Wenn man den Methioninsulfon- und Cysteinsäuregehalt eines Bakterienhydrolysates summiert und zu dem gemessenen Amino-N-Gehalt eines

Hydrolysates in ein Verhältnis setzt, so scheinen die Bakterienstämme, die wir anaerob züchteten, mehr schwefelhaltige Aminosäuren in ihrem mit Ninhydrin bestimmbaren Gesamtaminosäurebestand der Bakterienzellsubstanz zu besitzen als diejenigen, die wir aerob gezüchtet haben.

G. Literaturverzeichnis

ABDERHALDEN, E. und P. RONA: "Zusammensetzung des Eiweißes von Aspergillus niger bei verschiedener Stickstoffquelle", Z. physiol. Chem. 46, 179-86 (1905)

ANDERSON, R.F. und R.W. JACKSON: "Essential amino acids in microbial proteins", Appl. Microbiol. 6, 369-73 (1958)

ANDERSON, R.F., R.A. RHODES, G.E.N. NELSON, M.C. SHEKLETON, M. ARNOLD und A. BARRETO Jr.: "Lysine, methionine, and tryptophan content of microorganisms. 1. Bacteria", J. Bacteriol. 76, 131-35 (1958)

BABUDIERI, B.: "Die Zellstruktur und die Serologie der Leptospiren", Ergebn. Mikrobiol., Immunitätsforsch. exp. Therap. 33, 259-306 (1960)

BARROLLIER, J.: "Ein Ninhydrinreagenz für quantitative Aminosäurebestimmungen auf Papierchromatogrammen", Naturwissenschaften 42, 416 (1955)

"Beiträge zur Aminosäurebestimmung auf Papierchromatogrammen", Z. physiol. Chem. 309, 219-20 (1957)

"Methode zur Dokumentation von Dünnschichtchromatogrammen", Naturwissenschaften 48, 404 (1961)

Privatmitteilung (1964) Schering AG, Berlin, zitiert nach PATAKI, G.: "Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie", Berlin, Walter de Gruyter & Co. (1966), p. 73

BEILSTEINS Handbuch der organischen Chemie, Band VII, E I, Seite 475, Berlin, Verlag von Julius Springer (1931)

BRENNER, M. und A. NIEDERWIESER: "Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäuren", Experientia 16, 378-8 (1960)

"Durchlaufende Dünnschicht-Chromatographie", Experientia 17, 237-38 (1961)

BRENNER, M., A. NIEDERWIESER und G. PATAKI: in E. STAHL: "Dünnschichtchromatographie", Berlin, Springer Verlag (1962)

in A.T. JAMES und L.J. MORRIS: "New biochemical separations", London, Van Nostrand Co. (1964)

CAMIEN, M.N., A.J. SALLE und M.S. DUNN: "Investigations of amino acids, peptides, and proteins. XXII. Percentages of some amino acids in Lactobacilli", Arch. Biochem. 8, 67-78 (1945)

CAMPBELL, L.K.: "Studies on the amino acid content of the Tubercle Bacillus", Amer. Rev. Tbc. 11, 452-70 (1925)

CONSDEN, R., A.H. GORDON und A.J. MARTIN: "Quantitative analysis of proteins. A partition chromatographic method using paper", Biochem. J. 38, 224-32 (1944)

COPPOLA, S.: "Mikrobiochemische Untersuchung der freien und der die Zellproteine aufbauenden Aminosäuren von Azotobacter chroococcum Beijerinck Ann. Fac. Sci. agrar. Univ. Studi Napoli Portici (3) 30, 527-45 (1964/65), ital., zitiert nach Chem. Zbl. 34, 1386 (1967)

CUMMINS, C.S.: "The chemical composition of the bacterial cell wall", Int.Rev.Cytol. 5, 25-50 (1956)

CUMMINS, C.S. und H. HARRIS: "The chemical composition of the ce wall in some gram-positive bacteria

and its possible value as a taxonomic character", J.gen.Microbiol. 14, 583-600 (1956)

"Studies on the cell wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups", J.gen.Microbiol. 18, 173-89 (1958)

DESSI, P., A.M. GIANNI, G. PASINI und M. GRECO: "Freie Aminosäuren und Aminosäuren der Eiweißbausteine von gegenüber Terramycin resistenten Brucella melitensis", Giorn.Microbiol. 8, 122-28 (1960), ital., zitiert nach Chem.Zbl. 34, 12137 (1961)

DOCUMENTA GEIGY: "Wissenschaftliche Tabellen", Basel (1960)

DUC-NGUYEN, H. und L.L. WEED: "D-Ornithine as a constituent of a bacterial cell wall", J.Biol.Chem. 239, 3372-76 (1964)

DUNLOP, S.G.: "The synthesis of amino acids by E. coli in pure cultures", J.Bacteriol. 58, 457-62 (1949)

DUSTIN, J.P., C. CZAJKOWSKA, S. MOORE und E.J. BIGWOOD: "A study of the chromatographic determination of amino acids in the presence of large amounts of carbohydrate", Analyt. Chim.Acta 9, 256-62 (1953)

ECKSTEIN, H.C. und M.H. SOULE: "The nature of the proteins and lipids synthesized by the Colon Bacillus", J.Biol.Chem 91, 395-404 (1931)

FAHMY, A.R., A. NIEDERWIESER, G. PATAKI und M. BRENNER: "Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäuren auf Kieselgel G. Eine Schnellmethode zur Trennung und zum qualitativen Nachweis von 22 Aminosäuren", Helv. Chim.Acta 44, 2022-26 (1961)

FISCHER, F.G. und H. DÖRFEL: "Zur quantitativen Auswertung der Papierchromatogramme von Eiweiß-Hydrolysaten", Biochem. Zschr. 324 544-66 (1953)

FRANKLIN, L.D. und O.B. WILLIAMS: "Chromatographic analysis of the amino acid composition of bacterial spores", J.Bacteriol. 64, 766-67 (1952)

FREELAND, J.C. und E.F. GALE: "The amino acid composition of certain bacteria and yeasts", Bioche J. 41, 135-38 (1947)

FRENTZ, R.: "Chromatographie en couche mince des acides aminés urinaires", Ann. Biol. clin. 23, 1145-55 (1965)

GALE, E.F.: "Studies on bacterial amino acid decarboxylases", Biochem.J. 39, 46-52 (1945)

GREBUS, C.H., J.P. DEFRETIN und A. CREMIEUX: "Composition en acid aminés cellulaires de 4 souches de Mycobactéries", Bull.Soc.Chim.biol 47, 1281-85 (1965)

HINSBERG, K. und K. LANG: "Medizinische Chemie", München-Berlin-Wien, Urban & Schwarzenberg (1957)

HIRS, C.H.W.: "The oxidation of ribonuclease with performic acid", J.Biol.Chem. 219, 611-21 (1956)

HIRSCH, A. und C. CATTANEO: "Die Mycobakterien: Chemischer Au bau und Virulenz. 4. Mitteilung. Die ch romatographische Untersuchung d Aminosäuren im Zellhydrolysat der Mycobakterien verschiedener Spezie Zbl. Bakt.-Abt., I-Orig. 174, 533-4 (1959)

HUBER, J., W. SCHAKNIES und J. RÜCKBEIL: "Untersuchungen über die Eignung verschiedener Maisquell-wasserchargen für mikrobiologische

Produktionsprozesse", Pharmazie 18, 37-42 (1963)

JÄNCHEN, D.: "Über die Verwendung extrem kleinvolumiger Trennkammern in der Dünnschicht-Chromatographie", J.Chromatogr. 14, 261-64 (1964)

JAREMKO, S.W. und J.I. KARBATSCH: "Aminosäurezusammensetzung der hämolytischen Streptokokken", Mikrobiol.Z. 26, Nr.6, 58-62 (1964), ukrain., zitiert nach Chem.Zbl. 29, 1221 (1966)

JOHNSON, T.B. und E.B. BROWN: "The preparation of nucleic acid from the nucleoprotein of Tubercle Bacilli", J.Biol.Chem. 54, 721-30 (1922)

KANDLER, O. und C. ZEHENDER: "Papierchromatographische Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung verschiedener Bakterienhydrolysate", Arch.Mikrobiol. 24, 41-48 (1956)

KELEMEN, J. und G. PATAKI: "Einfluß der Schichtbereitung auf die Reproduzierbarkeit der Rf-Werte in der Dünnschicht-Chromatographie. 2.Mitt.: Vergleich luftgetrockneter und aktivierter Schichten", Z.analyt. Chem. 195, 81-6 (1963)

KISHINO, S.: "The relation of the quantity of cystine in bacterial protein and anaerobiosis", Jap.J.Exp.Med. 7, 575-7 (1930)

KRAMPITZ, G.: "Über die Verbesserung der Eiweißhydrolyse durch Proteinvorbehandlung mit Perameisensäure", Experientia 13, 239 (1957)

LEACH, M.F.: "On the chemistry of Bacterium coli communis", J.Biol.Chem. 1, 463-502 (1905-1906)

MARSHALL, J.H. und J.C. KELSEY: "A standard culture medium for general bacteriology", J.Hyg.Camb. 58, 367-72 (1960)

MICHL, H. und H. BACHMEYER: "Über freie Aminosäuren im Gifte de Gelbbauchunke Bombina variegata L. Mh. Chem. 95, 481-84 (1964)

MONDOLFO, H. und E. HOUNIE: "Ricerche sugli aminoacidi della cellula batterica", Boll. Ist. sieroter milan. 30, 650-59 (1951)

MOORE, S.: "On the determination of cystine as cysteic acid", J. Biol. Chem. 238, 235-37 (1963)

MOORE, S. und W.H. STEIN: "Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids", J. Biol. Chem. 176, 367-88 (1948)

MOROS, A.F.: "Gehalt an freien und gebundenen Aminosäuren in den Kulturen von Staphylokokken, die in Versuchen in vitro eine Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika erworben haben, sowie in Stämmen von Kranke während der Antibiotikabehandlung", Antibiotika 5, Nr. 2, 76-83 (1960), russ., zitiert nach Chem. Zbl. 31, 11250 (1962)

MUELLER, J.M., J.G. PIERCE, H. DAVOLL und V. DU VIGNEAUD: "The oxidation of oxytocin with performic acid", J. Biol. Chem. 191, 309-13 (1951)

MUKHERJEE, H.: "Amino acids of red sulphur bacteri Nature 184, 1742-3 (1959)

NEIDHARDT, F.C.: "Effects of environment on the composition of bacterial cells", Ann. Re Microbiol. 17, 61-85 (1963)

NEU, W.: Diplomarbeit, Universität Gießen (1963), zitiert nach G. PATAKI: "Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie", Berlin, Walter de Gruyter & Co. (1966), p. 137

OBRAZCOVA, A.A. und M.B. PETRENKO: "Aminosäurezusammensetzung einiger Rhizosphärenbakterien", Mikrobiol. Z. 28, Nr. 1, 15-20 (1966), ukrain., zitiert nach Chem. Zbl. 11, 1371 (1967)

PARNAS, J.: "Sugars and amino acids in Brucella and some other Parvobacteriaceae", Bull.Acad.Polon.Sci., Sér.Sci.Biol. 13, 331-37 (1965), engl.

PATAKI, G.: "Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie", Berlin, Walter de Gruyter & Co. (1966)

PAULETTA, G. und A. DEFRANCESCHI: "Studies on the amino acid metabolism of Mycobacterium tuberculosis. I. Preliminary investigation by paper chromatography", Biochim.biophys. Acta 9, 271-82 (1952)

PERKINS, H.R. und C.S. CUMMINS: "Chemical structure of bacterial cell walls. Ornithine and 2,4-diaminobutyric acid as components of the cell walls of plant pathogenic Corynebacteria", Nature 201, 1105-07 (1964)

PIERCE, J.G.: "Separation of the glycyl from the phenylalanyl chain of oxidized insulin by countercurrent distribution", J.Am.Chem.Soc. 77, 184-86 (1955)

POLSON, A.: "Quantitative partition chromatography and the composition of E. coli", Biochim.biophys.Acta 2, 575-81 (1948)

PURKAYASTHA, M. und P. NANDI: "Amino acid composition of four spezies of Azotobacter", Trans.Bose Res. Inst. Calcutta 25, 25-7 (1962)

PURSER, D.B. und S.M. BUECHLER: "Amino acid composition of rumen organisms", J.Dairy Sci. 49, 81-4 (1966)

PUSSTOWALOWA, L.M.: "Die quantitative Aminosäurezusammensetzung von Cholera- und cholera-ähnlichen Vibrionen", Biochemie 26, 970-74 (1961), russ., zitiert nach Chem. Zbl. 29, 10520 (1962)

RAO, N.A.N. und T.K. WADHWANI: "The amino acid composition of the cellular protein of Mycobacterium tuberculosis", J. Bacteriol. 72, 12-5 (1956)

REUSSER, F., J.F.T. SPENCER und H.R. SALLANS: "Essential amino acids in microorganisms", Can.J. Microbiol. 3, 721-28 (1957)

ROKKONES, T.: "Thin layer chromatography of amin acids in urine", Scandinav.J.clin. Labor.Invest. 16, 149-52 (1964)

ROMAHN, A.: "Papierchromatographische Untersuchung der Aminosäuren im Zellhydrolysat von Bacterium bifidum", Dissertation Universität des Saarlandes (1961)

ROMAHN, A., W. BURMEISTER und J.B. MAYER: "Papierchromatographische Untersuchung des Aminosäuregehaltes von Bacterium bifidum Z.Kinderheilk. 85, 210-16 (1961)

RYMKIEWICZ, D.: "Comparative chromatographic analysis of amino acids of vegetative cells and homologous spores of proteolytic Clostridia", Bull.Acad. Polon.Sci., Ser.Sci.Biol. 7, 69-72 (1959), engl.

"Comparative chromatographic analysis of amino acids of vegetative cells and homologous spores of Clostridium perfringens", Bull.Aca Polon.Sci., Ser.Sci.Biol. 8, 199-2 (1960), engl.

SALTON, M.R.J.: "Bacterial cell walls" in "Bacterial anatomy", Symp.Soc.gen.Microbiol 6, 81-110 (1956)

SANGER, F.: "Fractionation of oxidized insulin", Biochem.J. 44, 126-28 (1949)

SAPOSNIKOV, V.N. und V.S. ISAEVA: "Freie Aminosäuren von Proteus

vulgaris", Mikrobiologija 36, 31-7 (1967), russ., zitiert nach Chem. Zbl. 11, 1270 (1968)

SAVOIA, F.: "Chemische Zusammensetzung des Protoplasmas der Bakterien (Sarcina)", Boll.Soc.ital.Biol.sperim. 35, 1177-8 (1959), ital., zitiert nach Chem.Zbl. 37, 1284 (1965)

SCHREIER, K. und E. RUTHE: "Einige Untersuchungen zum Aminosäurestoffwechsel pathogener und nichtpathogener Colistämme", Zbl. Bakt.-Abt. I-Orig. 163, 154-65 (1955)

SEN, R.: "Free amino acid pool in strains of Shigellae", Experientia 18, 68-9 (1962)

SIEFERT, G.: "Biochemische Untersuchungen über den Bau von Spirochäten", Arch. Mikrobiol. 29, 406-19 (1958)

SOROKIN, P.P.: "Aminosäurezusammensetzung einiger grampositiver und gramnegativer Bakterien", Ukrainskyj biochim.Z. 37, 239-42 (1965), russ., zitiert nach Chem.Zbl. 33, 1206 (1966)

SORU, E.: "Die freien intrazellulären Aminosäuren bei Mycobacterium tuberculosis B.C.G. und bei seinen gegen Streptomycin, p-Aminosalicylsäure und Isoniazid resistenten Varianten", Studii cercetari Biochim.Bucuresti 4, 23-30 (1961), russ., zitiert nach Chem.Zbl. 37, 1180 (1964)

STAHL, E.: "Dünnschicht-Chromatographie. 2. Mitt.: Standardisierung, Sichtbarmachung, Dokumentation und Anwendung", Chemiker Ztg. 82, 323-9 (1958)

in E. STAHL: "Dünnschichtchromatographie", Berlin, Springer Verlag (1962)

STOKES, J.L. und M. GUNNES: "The amino acid composition of microorganisms", J.Bacteriol. 52, 195-207 (1946)

TAMURA, S.: "Zur Chemie der Bakterien. 1. Mitt.", Z. physiol.Chem. 87, 85-114 (1913, a)

TAMURA, S.: "Zur Chemie der Bakterien. 2. Mitt.", Z.physiol.Chem. 88, 190-98 (1913, b)

TEPPER, B.S. und J.B. WILSON: "A comparison of the amino acid composition and nucleic acid content of strains of Brucella abortus", J.of Inf.Dis. 103, 19-24 (1958)

TOENNIES, G.: "The oxidative conversion of casein into protein free of methionine and tryptophan ", J.Biol.Chem. 145, 667-70 (1942)

TOENNIES, G. und R.P. HOMILLER: "The oxidation of amino acids by hydrogen peroxide in formic acid", J.Amer.Chem.Soc. 64, 3054-56 (1942)

TROLL, W. und R.K. CANNAN: "A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids", J.Biol.Chem. 200, 803-11 (1953)

WILSON, J.B. und B.L. DASINGER: "Biochemical properties of virulent and avirulent strains of Brucella", Ann.N.Y.Acad.Sci. 88, 1155-64 (1960)

WORK, E.: "Chromatographic investigations of amino acids from microorganisms. I. The amino acids of Corynebacterium diphtheriae", Biochim.biophys. Acta 3, 400-11 (1949)

"Chromatographic investigations of amino acids from microorganisms. II. Isolation of two unknown substance from C.diphtheriae", Biochim.biophy Acta 5, 204-9 (1950)

"The isolation of α,ε-diaminopimelic acid from C. diphtheriae and M. tuberculosis", Biochem. J. 49, 17-23 (1951)

"Biochemistry of the bacterial cell wall", Nature 179, 841-47 (1957)

"Mucopeptides of bacterial cell walls. A review", J. gen. Microbiol. 25, 167-89 (1961)

"The amino acids of bacterial cell walls", Biochem. J. 82, 35 P - 36 P (März 1962)

"Amino acids of walls of Micrococcus radiodurans", Nature 201, 1107-9 (1964)

WORK, E. und D.L. DEWEY: "The distribution of α,ε-diaminopimelic acid among various microorganisms", J. gen. Microbiol. 9, 394-409 (1953)

WRIGHT, D.N. und W.R. LOCKHART: "Environmental control of cell composition in Escherichia coli", J. Bacteriol. 89, 1026-31 (1965)

YOUNG, F.E.: "Variation in the chemical composition of the cell walls of Bacillus subtilis during growth in different media", Nature 207, 104-5 (1965)

Herrn Professor Dr. med., Dr. phil. W. Zimmermann möchte ich danken für die Überlassung des Dissertationsthemas, für die Möglichkeit, den experimentellen Teil dieser Arbeit unter angenehmen Bedingungen an seinem Institut auszuführen, sowie für wertvolle Hinweise bei der Durchführung der Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. rer. nat. R. Schweisfurth und Herrn Dipl.-Chem. C. Rübelt für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 21. November 1941 wurde ich, Hartwin Bieber, als Sohn des Prokuristen Otto Bieber und seiner Ehefrau Frieda geb. Heinze in Dresden geboren.

Nach Kriegsende zogen meine Eltern nach Duisburg. Dort besuchte ich von 1948 bis 1952 die Volksschule. 1952 trat ich in das neusprachliche Steinbart - Gymnasium zu Duisburg ein. Nach neunjähriger Schulzeit bestand ich 1961 vor dem Prüfungsausschuß dieses Gymnasiums die Reifeprüfung.
In den zwei folgenden Jahren leistete ich meinen Militärdienst bei der Bundeswehr ab.
1963 schrieb ich mich an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken für das Studium der Humanmedizin ein. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich 1964 mit der Gesamtnote "gut" , die ärztliche Vorprüfung 1966 ebenfalls mit der Gesamtnote "gut" an dieser Universität ab.

Im Augenblick bereite ich mich auf die ärztliche Prüfung vor, die ich im Sommersemester 1969 abzulegen beabsichtige.

ROTAPRINT-
OFFSET-
DRUCKEREI
Klein
6602 DUDWEILER
Scheidter Straße 26
Tel. Sulzbach 7 32 84
IHR LIEFERANT FÜR DRUCKSACHEN ALLER ART